

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE L'AMYLOÏDOGENÈSE ET  
DE LA CYTOTOXICITÉ DE L'ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE (IAPP)

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

CAROLE ANNE DE CARUFEL

FÉVRIER 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Ici se termine un autre  
merveilleux chapitre...





## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette réussite. Tout d'abord, ma famille pour leurs encouragements à poursuivre mon travail dans les moments difficiles. Mes amis pour leur écoute, leur soutien et leurs nouvelles idées. Puis, tous mes collègues, Mathieu Laporte-Wolwertz, Phuong Trang Nguyen, Armelle Nérée Tchoumi et Noé Quittot qui ont su mettre une ambiance agréable, amicale et musicale incroyable au laboratoire.

J'aimerais également remercier les organismes subventionnaires, le GRASP, la fondation UQÀM ainsi que le FQRNT pour leur soutien financier. Un merci tout particulier au regroupement PROTEO, grâce à qui j'ai eu la chance d'assister au congrès de Protein Society en Europe, en plus de faire un stage de trois mois au Scripps Research Institute en Californie avec le Pr Jeffery W. Kelly.

Finalement, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Pr Steve Bourgault, pour toutes ses idées et pour son soutien moral et financier. Je suis très reconnaissante qu'il m'ait ouvert les portes de son laboratoire il y a presque trois ans maintenant. Ce fut une expérience formidable et bien sûr, enrichissante.

Merci.



## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....	ix
RÉSUMÉ.....	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1.1 Mauvais repliement protéique.....	1
1.1.2 Maladies amyloïdes.....	2
1.1.3 Diabète de type II.....	4
1.1.4 Dépôts amyloïdes des îlots de Langerhans.....	5
1.2 Islet Amyloid Polypeptide (IAPP).....	6
1.2.1 Biosynthèse de l'IAPP.....	6
1.2.2 Structure primaire et évolution phylogénique.....	9
1.2.3 Structures secondaires de l'IAPP.....	11
1.2.4 Récepteurs et activités biologiques.....	13
1.3 Fibres amyloïdes et agrégation.....	16
1.3.1 Structure des fibres amyloïdes.....	16
1.3.2 Mécanismes de formation de fibres amyloïdes.....	21
1.3.3 Implications des espèces intermédiaires; l'épingle- $\beta$ et l'hélice- $\alpha$ .....	23
1.3.4 Rôles des cofacteurs.....	25
1.4 Cytotoxicité de l'IAPP.....	31
1.4.1 Espèces cytotoxiques.....	31
1.4.2 Cytotoxicité induite par la perméabilisation membranaire.....	33
1.4.3 Rôle des voies apoptotiques.....	34

1.4.4 Cytotoxicité par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	35
1.4.5 Induction du stress du réticulum endoplasmique.....	36
1.4.6 Implication de l'autophagie .....	36
CHAPITRE II	
PROBLÉMATIQUE ET SUJET D'ÉTUDE.....	39
2.1 Hypothèse.....	40
2.2 Objectifs du projet.....	41
CHAPITRE III	
ARTICLE I : DELINEATING THE ROLE OF HELICAL INTERMEDIATES IN NATIVELY UNFOLDED POLYPEPTIDE AMYLOID ASSEMBLY AND CYTOTOXICITY .....	43
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	81
CHAPITRE V	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	89
ANNEXE A	
ARTICLE II : NEW INSIGHTS INTO THE ROLES OF SULFATED GLYCOSAMINOGLYCANS IN ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE AMYLOIDOGENESIS AND CYTOTOXICITY.....	91
ANNEXE B	
ARTICLE III : SYNTHESIS OF 2,5-DIARYL-SUBSTITUTED TIOPHENES AS HELICAL MIMETICS: TOWARDS THE MODULATION OF ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE (IAPP) AMYLOID FIBRIL FORMATION AND CYTOTOXICITY .....	103
BIBLIOGRAPHIE	

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Diagramme énergétique du repliement protéique (Campioni et al., 2010)..... 2
1.2	Dépôts amyloïdes retrouvés au niveau d'îlots pancréatiques d'un patient souffrant de diabète de type II observés par (A) coloration au rouge de Congo et (B) par microscopie électronique (Westermarck, 2011)..... 5
1.3	Biosynthèse de l'islet amyloid polypeptide. .... 8
1.4	Représentation de la structure secondaire de l'IAPP en présence de micelles de sodium dodécyl sulfate à pH physiologique (PDB 2L86) (Nanga et al., 2011). .... 13
1.5	Récepteurs de l'IAPP composés du récepteur de la calcitonine en association avec les différentes protéines RAMPs. .... 15
1.6	Patron de diffraction aux rayons X de fibres amyloïdes d'IAPP (Makin et Serpell, 2005)..... 17
1.7	Structure générale des fibres amyloïdes en feuillet- $\beta$ -croisé. .... 18
1.8	Image des fibres d'IAPP d'une solution hétérogène par microscopie à transmission électronique (Luca et al., 2007). .... 19
1.9	Modèles de fibres amyloïdes de l'islet amyloid polypeptide, proposés par Luca et collègues suite aux études de RMN au $^{13}\text{C}$ (Luca et al., 2007)..... 20
1.10	Courbe de formation de fibres amyloïdes de l'islet amyloid polypeptide par polymérisation nucléation-dépendante. .... 22
1.11	Représentation du mécanisme d'amyloïdogenèse proposé en présence de biomolécules anioniques ou de solvants et impliquant l'intermédiaire hélicoïdal..... 25
1.12	Structures des glycosaminoglycanes..... 26
1.13	Représentation du mécanisme proposé pour la formation de fibres amyloïdes de l'IAPP en présence de glycosaminoglycanes (De Carufel et al., 2013).... 28
1.14	Structure de l'insuline (PDB 1ZNI) (Bentley et al., 1976). .... 29

1.15	Représentation du mécanisme proposé pour la formation de fibres amyloïdes de l'IAPP en présence de membranes modèles (Knight et al., 2006). ....	31
1.16	Résumé des effets cytotoxiques induits par l'IAPP. ....	33
4.1	Séquence de l'hIAPP et de son analogue conformationnellement restreint, D-hIAPP. ....	82
4.2	Structure des molécule 2l et 9a (Hassanpour et al., 2014). ....	88

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Protéines et peptides occasionnant diverses pathologies suite à la formation de fibres amyloïdes .....	3
1.2 Séquence primaire de l'IAPP chez différentes espèces. ....	10
1.3 Comparaison des séquences primaires des membres de la famille des calcitonines. ....	11





## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

Å	Angström
A $\beta$	Peptide amyloïde- $\beta$
$\alpha$ -syn	$\alpha$ -synucléine
ADM	Adrénomodulline
AFM	Microscopie à force atomique
CD	Dichroïsme circulaire
CGRPs	Peptides reliés au gène de la calcitonine
CRLR	Calcitonin-receptor-like receptor
CT	Calcitonine
CTR	Récepteur de la calcitonine
D-hIAPP	hIAPP [D-Phe15, D-Leu16]
EPR	Résonance paramagnétique électronique
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GAGs	Glycosaminoglycanes

x

HFIP	Hexafluoroisopropanol
hIAPP	IAPP humain
IAPP	Islet amyloid polypeptide
PC	Proprotéine convertase
RAMP	Receptor-activity modifying protein
RE	Réticulum endoplasmique
rIAPP	IAPP de rat
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS	Sodium dodécyl sulfate
STEM	Microscopie par transmission électronique à balayage
TEM	Microscopie par transmission électronique
TFE	Trifluoroéthanol
ThT	Thioflavine T

## RÉSUMÉ

Le mauvais repliement de protéines et leur dépôt sous forme de fibres amyloïdes sont associés à diverses pathologies, telles que la maladie de l'Alzheimer et le diabète de type II. Chez les patients diabétiques, des dépôts amyloïdes sont retrouvés au niveau des îlots de Langerhans. Ceux-ci sont principalement composés de l'islet amyloid polypeptide (IAPP). L'IAPP sous forme monomérique affiche une structure native principalement désordonnée. Toutefois, il a été observé que la liaison de l'IAPP à des biosurfaces anioniques, notamment les membranes modèles et les glycosaminoglycanes (GAGs), induisait un réarrangement conformationnel du peptide allant d'une structure aléatoire vers une hélice- $\alpha$ . Les nombreuses études effectuées sur l'impact de cet intermédiaire semblent indiquer que cette espèce conformationnelle serait importante dans le processus de formation de fibres amyloïdes. Seulement, aucune évidence ne permet de postuler si cette structure transitoire est « *on* » ou « *off-pathway* » dans ce processus ni si elle est impliquée dans la dégénérescence cellulaire. L'utilisation des approches spectroscopiques classiques rend difficile l'étude approfondie des intermédiaires structuraux de la cascade amyloïdogénique. Le but de cette étude était donc de déterminer le rôle de l'intermédiaire hélicoïdal par l'utilisation d'analogues affichant des ensembles conformationnels restreints en milieu homogène et mimant l'environnement de la membrane plasmique. Finalement, nous nous sommes intéressés au rôle de l'intermédiaire hélicoïdal sur la viabilité de cellules pancréatiques.

Pour ce faire, nous avons développé des analogues de l'IAPP humain (hIAPP) où deux acides aminés consécutifs du domaine hélicoïdal ont été remplacés par leur énantiomère de conformation D. Cette modification est connue pour déstabiliser la structure secondaire en hélice- $\alpha$  sans modifier les propriétés physicochimiques du peptide. Parmi les dérivés synthétisés, seul l'analogue [D-Phe<sup>15</sup>, D-Leu<sup>16</sup>] hIAPP (D-hIAPP) affichait une conformation désordonnée persistante et ce, même en présence de trifluoroéthanol (TFE). Il a été observé, par le suivi de la fluorescence de la thioflavine T, que les deux peptides avaient une cinétique d'agrégation semblable. Ils ont également la capacité de co-assembler afin de former des fibres amyloïdes matures, probablement par une même cascade amyloïdogénique. Ceci suggère que la déstabilisation de l'hélice- $\alpha$  n'induit pas de changement dans le processus amyloïdogénique en milieu homogène et serait une espèce « *off-pathway* ». En présence de liposomes de DOPC/DOPG (7:3) et de GAGs, la formation d'un intermédiaire hélicoïdal était observée chez l'hIAPP alors que seule une structure secondaire en feuillet- $\beta$  était apparente pour le D-hIAPP. Bien que la formation de fibres amyloïdes fût accélérée pour les deux peptides, la phase de latence du D-hIAPP

était presque absente. Ceci suggère que la formation d'un intermédiaire hélicoïdal n'est pas nécessaire à la formation de fibres amyloïdes en milieu hétérogène. Les deux peptides ont la capacité d'induire une perturbation de membranes modèles de façon concentration dépendante qui corrèle avec leur cinétique amyloïdogénique. Cette observation démontre l'implication de l'élongation des protofibrilles sur la membrane plutôt que de l'insertion membranaire de l'hélice- $\alpha$ . De plus, l'incapacité d'adopter une hélice- $\alpha$  transitoire accentue et accélère l'effet cytotoxique et pro-apoptotique sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Ainsi, il semblerait que l'intermédiaire hélicoïdal ne soit pas nécessaire aux processus amyloïdogéniques et cytotoxiques de l'IAPP et qu'au contraire, sa stabilisation, grâce à de petites molécules, pourrait entraîner l'inhibition de la formation de fibres amyloïdes.

Mots clés : islet amyloid polypeptide, fibres amyloïdes, intermédiaire hélicoïdal, membranes modèles, glycosaminoglycanes.

## CHAPITRE I

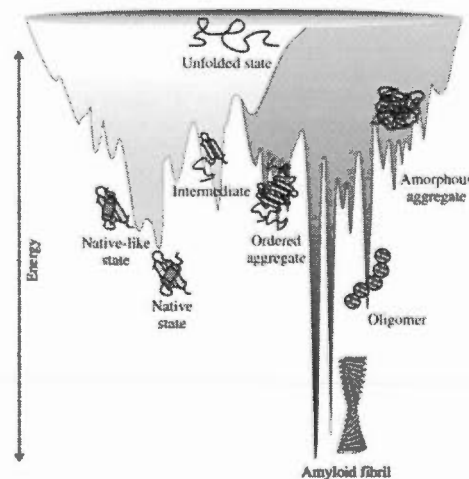
### INTRODUCTION

#### 1.1 Maladies associées au mauvais repliement de protéines

##### 1.1.1 Mauvais repliement protéique

Le repliement des protéines est une étape clé lors de la synthèse protéique. Afin d'acquérir leurs fonctions biologiques, les protéines doivent adopter une conformation hautement ordonnée de faible énergie (Figure 1.1) (Campioni et al., 2010). Plusieurs protéines s'associeront avec des protéines chaperonnes afin de se replier adéquatement. D'autres adopteront leur conformation biologiquement active grâce à leurs propriétés physico-chimiques conférées par leur séquence primaire. Cependant, certaines protéines seront incapables d'adopter leur conformation native, occasionnant un mauvais repliement. Ces protéines seront alors principalement dégradées par le protéasome et parfois même par autophagie. Le mauvais repliement de protéines est divisé en deux grandes classes qui mènent au développement de diverses pathologies. Tout d'abord, un mauvais repliement menant à la perte de fonction consiste en une protéine qui, suite à un repliement erroné, devient inactive et subit une dégradation excessive par le protéasome (Powers et al., 2009; Campioni et al., 2010). C'est entre autres le cas de la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) impliquée dans la fibrose kystique (Collawn et Matalon, 2014). En effet, la délétion du résidu F508 (F508del-CFTR) empêche CFTR d'adopter sa conformation native. Elle est alors envoyée au protéasome afin d'être dégradée. Ses fonctions n'étant

plus effectuées, plusieurs symptômes apparaissent menant ultimement à l'insuffisance pulmonaire. Au contraire, la deuxième classe comprend les mauvais repliements entraînant un gain de fonction toxique. La protéine impliquée ne se replie pas correctement et mène à la formation d'agrégats. Cette agrégation est nuisible pour les organes vitaux qui sont touchés, conférant ainsi une fonction toxique à la protéine. Ainsi, les protéines ou peptides formant des agrégats structurés appelés fibres amyloïdes, tel le peptide amyloïde- $\beta$  ( $A\beta$ ) et la transthyréline, font partie de cette classe (Powers et al., 2009).



**Figure 1.1** Diagramme énergétique du repliement protéique (Campioni et al., 2010).

### 1.1.2 Maladies amyloïdes

Plus d'une trentaine de protéines dont leur agrégation, sous forme de fibres amyloïdes, est associée à diverses pathologies ont été répertoriées à ce jour (Tableau 1.1) (Chiti et Dobson, 2006). Ces protéines sont largement distribuées à travers le corps humain. La maladie amyloïde la plus connue est la maladie d'Alzheimer, principalement

caractérisée par l'agrégation du peptide A $\beta$  (Masters et al., 1985). Ce peptide composé de 40 à 42 acides aminés forme des plaques amyloïdes au niveau du cerveau où il contribue à la dégénérescence neuronale. Les chaînes légères d'immunoglobulines, anormalement sécrétées en très grande quantité, ont également la possibilité de former des fibres amyloïdes, principalement au niveau du cœur, du foie et des reins, induisant ainsi l'apparition de l'amyloïdose à chaîne légère (Martin et Ramirez-Alvarado, 2010). La transthyrétine, une protéine homotétramérique retrouvée au niveau sanguin, comporte parfois certains résidus mutés. Ces mutations peuvent mener à la déstabilisation du tétramère et à l'agrégation du monomère en fibres amyloïdes (Johnson et al., 2012). Ces dépôts se retrouvent entre autres au niveau du cerveau et du cœur et causent diverses polyneuropathies et amyloïdoses. Finalement, le diabète de type II compte parmi les maladies amyloïdes, puisque des dépôts protéiques de nature amyloïde sont retrouvés au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques des îlots de Langerhans (Opie, 1901).

**Tableau 1.1** Protéines et peptides occasionnant diverses pathologies suite à la formation de fibres amyloïdes

Protéine/peptide impliqué	Principaux organes affectés	Maladie associée
<b>Amyloïde-<math>\beta</math></b>	Cerveau	Maladie d'Alzheimer
<b>Transthyrétine</b>	Système nerveux périphérique, reins, cœur, thyroïde et intestin	Polyneuropathie familiale, amyloïdose systémique
<b>Chaînes légères d'immunoglobulines</b>	Reins, cœur et foie	Amyloïdose à chaîne légère
<b>Protéine Prion</b>	Système nerveux central	Encéphalopathie spongiforme
<b>Islet Amyloid Polypeptide</b>	Pancréas	Diabète de type II

### 1.1.3 Diabète de type II

Le diabète est une maladie associée à une mauvaise régulation de la glycémie sanguine. Selon la Fédération Internationale du Diabète, près de 387 millions d'individus à travers le monde étaient atteints du diabète en 2014 et ce nombre est en perpétuelle progression. Près de 90% de ces diabétiques souffrent du type II (Saltiel, 2001), qui est associé à un niveau de glucose sanguin élevé ainsi qu'à une résistance à l'insuline au niveau des organes périphériques. Plusieurs facteurs tels que le vieillissement, un mode de vie sédentaire, l'obésité, la fumée de cigarette et certaines prédispositions génétiques sont susceptibles de mener au développement du diabète. Un mode de vie sédentaire ainsi que l'obésité retrouvés de plus en plus tôt chez les enfants mènent au développement de la maladie non plus seulement chez les individus de plus de quarante ans, mais également chez les jeunes de moins de quinze ans (Hossain et al., 2007).

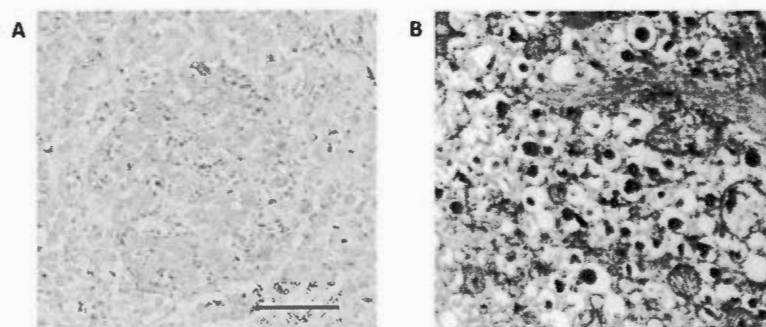
Sous conditions physiologiques normales, le corps garde un taux de glucose sanguin de 5 mM (Voet et Voet, 2004). Lorsque le niveau glycémique sanguin devient plus élevé, le glucose est transporté à l'intérieur de la cellule par les récepteurs Glut2 (Magnan et Ktorza, 2005). Il est alors phosphorylé par des glucokinases puis oxydé afin de former de l'ATP. L'augmentation du ratio ATP/ADP cause la fermeture des canaux potassium-dépendant, dépolarisant la cellule. Les canaux calcium-dépendant s'ouvrent, augmentant la concentration de calcium dans le cytosol ce qui permet la fusion des vésicules de sécrétion contenant l'insuline avec la membrane. Cette sécrétion d'insuline permet l'activation de la phosphoprotéine phosphatase-1 qui activera les enzymes de la glycogénèse.

Or, chez les patients atteints du diabète de type II, on observe une résistance à l'insuline principalement causée par une désensibilisation de son récepteur (Nankervis et al., 1985; Rizza et al., 1985). Afin de compenser pour cette résistance, les cellules  $\beta$ -pancréatiques augmentent leur niveau de sécrétion d'insuline (Hebda et Miranker,



2009). Cette surproduction cause un stress métabolique qui ultimement, mène à la détérioration des cellules- $\beta$  et à la chute de la sécrétion d'insuline.

Des dépôts protéiques au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques des îlots de Langerhans ont été observés chez les patients atteints de diabète de type II (Figure 1.2) (Westermarck, 2011). Ceux-ci seraient associés à la dégénérescence et à la perte de masse des cellules du pancréas. Ils sont principalement composés de l'Islet Amyloid Polypeptide (IAPP ou amyline).



**Figure 1.2** Dépôts amyloïdes retrouvés au niveau d'îlots pancréatiques d'un patient souffrant de diabète de type II observés par (A) coloration au rouge de Congo et (B) par microscopie électronique (Westermarck, 2011).

#### 1.1.4 Dépôts amyloïdes des îlots de Langerhans

C'est en 1901 que la première description de dépôts amyloïdes au niveau des îlots de Langerhans de patients atteints de diabète de type II a été documentée (Opie, 1901). Cependant, l'incapacité de détecter ces plaques avec le colorant habituellement utilisé pour discerner les amyloïdes causait un débat quant à la nature de cette observation. Ce fut suite aux travaux de Ehrlich et Ratner que les dépôts situés au niveau du pancréas ont été établis comme étant des dépôts amyloïdes (Ehrlich et Ratner, 1961). En testant

plusieurs colorants spécifiques à la structure des amyloïdes sur ces dépôts pancréatiques, ils ont observé une réponse positive au Rouge de Congo. De plus, la possibilité de les colorer à l'aide du Bleu Alcian démontrait la présence de glycosaminoglycanes (GAGs) parmi ces plaques amyloïdes. Bien que ces dépôts soient reconnus comme amyloïde, peu de chercheurs s'y sont intéressés, principalement en raison de leur inexistence chez le rat et la souris ainsi qu'à leur présence chez certains patients sains.

L'extraction et la purification des dépôts amyloïdes présents au niveau des îlots de Langerhans furent difficiles. En effet, la protéine ne représente que 1% de la masse totale du pancréas et sa solubilité est tout aussi difficile que les autres protéines amyloïdogéniques déjà étudiées. Ce n'est qu'en 1986, par l'utilisation de cellules- $\beta$  tumorales, que le groupe de recherche de Westermark est parvenu à caractériser un peptide de 37 acides aminés auquel ils donnèrent le nom de Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) (Westermark et al., 1986; Westermark et al., 1987). Leur observation a été confirmée par un groupe de recherche américain qui nomma le peptide amyline (Cooper et al., 1987).

## 1.2 Islet Amyloid Polypeptide (IAPP)

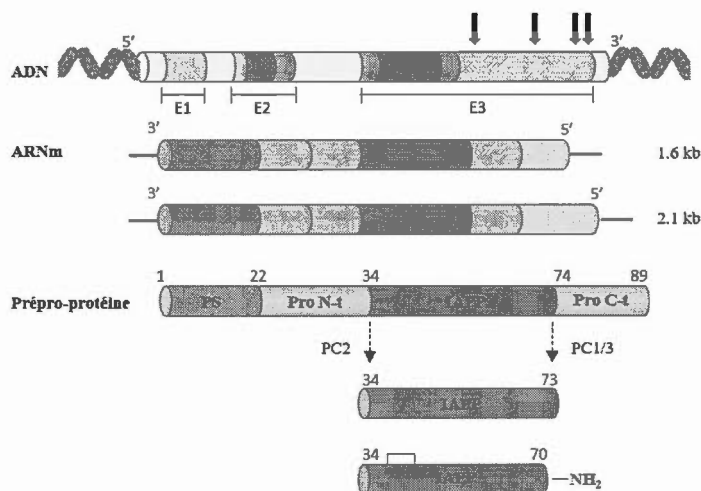
### 1.2.1 Biosynthèse de l'IAPP

Ce n'est qu'en 1988, soit 87 ans après la première observation de dépôts amyloïdes pancréatiques, que le gène codant pour l'IAPP a été identifié et séquencé. Pour ce faire, Mosselman et collègues ont utilisé des sondes à ADN codant pour la séquence primaire de l'IAPP afin de détecter la suite nucléotidique correspondante au peptide (Mosselman et al., 1988). Le gène complet de l'IAPP se trouve sur le bras court du chromosome 12, dans la région q14-pter. Il démontre une séquence beaucoup plus longue que celle

menant à la traduction d'un peptide de 37 acides aminés. Deux ARNm ont été identifiés suite à la transcription du gène de l'IAPP; l'un comprend 1.6 kb tandis que le deuxième est composé de 2.1 kb (Mosselman et al., 1988). L'analyse de ces transcrits a permis d'établir le gène complet de l'IAPP ( Figure 1.3) (Hoppener et al., 1992). Celui-ci comprend trois exons précédés par un promoteur de type boîte TATA (TATAA). Bien que le premier exon soit non codant, il sert de site de coiffe. L'exon 2 contient la séquence du codon initial, du peptide signal ainsi qu'une partie du propeptide N-terminal. La séquence de l'IAPP mature se situe dans l'exon 3, tout comme le propeptide C-terminal et une partie du propeptide N-terminal (Mosselman et al., 1989; Christmanson et al., 1990). Il possède également deux introns situés entre les différents exons et quatre sites de polyadénylation (représenté par des flèches à la figure 1.3) (Hoppener et al., 1992).

Le gène code donc pour un précurseur prépro de l'IAPP qui, lorsque traduit par la machinerie ribosomale, comporte 89 acides aminés, une séquence peptide signal, deux sites protéolytiques dibasiques et une région menant à l'amidation de l'extrémité C-terminale (Sanke et al., 1988; Mosselman et al., 1989; Christmanson et al., 1990). La séquence signal, permettant sa sécrétion extracellulaire, sera clivée au niveau du réticulum endoplasmique rugueux par la peptidase signal afin de former le pro-IAPP. Ce peptide de 67 résidus sera ensuite encapsulé dans les vésicules de sécrétion avec la pro-insuline pour un ratio de 1:100 (Kahn et al., 1990). Ce sera également dans ces vésicules que le pro-IAPP sera clivé, tout comme la pro-insuline, par les enzymes proprotéines convertases PC1/3 et 2 aux sites dibasiques Lys-Arg. PC1/3 est responsable du clivage entre Arg et Asn en position C-terminale du site dibasique alors que la PC2 clive au site N-terminal, entre les résidus Arg et Tyr (Badman et al., 1996; Marzban et al., 2004). L'IAPP subira ensuite deux autres modifications post-traductionnelles, soient la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 2 et 7 ainsi que l'amidation de la fonction carboxylique C-terminale par la carboxypeptidase E et le complexe *peptidyl amidating monooxygenase* (Marzban et al., 2005; Abedini et

Raleigh, 2010). Ainsi, l'IAPP en milieu physiologique constitue un peptide de 37 acides aminés comportant trois charges positives.



**Figure 1.3** Biosynthèse de l'islet amyloid polypeptide.

Les différents exons (E1, E2 et E3) sont identifiés sur la représentation du brin d'ADN. Les régions non codantes sont colorées en jaune et les introns sont représentés en beige. Les flèches noires exposent les quatre sites de polyadénylation. Le domaine du peptide signal (PS) apparaît en vert alors que domaine du propeptide N-terminal (Pro-Nt) et du propeptide C-terminal (Pro-Ct) sont en mauve. Les sites de clivages dibasiques par les enzymes proprotéine convertase (PC) sont mis en évidence par les flèches pointillées.

Bien que l'IAPP soit cosynthétisé et cosécrété avec l'insuline au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques en réponse au niveau de glucose sanguin (Kahn et al., 1990), aucune évidence quant à une co-expression de leur gène n'a été répertoriée. Ainsi l'IAPP est principalement exprimé au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques des îlots de Langerhans. Toutefois, il a été démontré que l'IAPP retrouvé chez le rat était également exprimé au

niveau du duodénum, de l'estomac et dans les ganglions de la racine dorsale (Asai et al., 1990).

### 1.2.2 Structure primaire et évolution phylogénique

L'IAPP est retrouvé chez plusieurs espèces tels les félins, les canins ainsi que les rongeurs (Tableau 1.2). La majorité de la séquence primaire du peptide a été conservée au fil de l'évolution, témoignant de l'importance physiologique de cette hormone peptidique (Nishi et al., 1989). C'est essentiellement la région 20-29 qui a évolué d'une espèce à l'autre. Chez l'humain, cette région est fortement hydrophobe, lui conférant son caractère amyloïdogénique. Chez l'IAPP retrouvé chez les rongeurs, on remarque la présence de six résidus mutés, principalement au niveau de la région 20-29, dont trois sont remplacés par des prolines (Nishi et al., 1989). Cet homologue est connu pour son incapacité à former des fibres amyloïdes et son caractère non toxique. En outre, la pathologie du diabète de type II n'est pas retrouvée chez les rongeurs. Afin de comprendre ce phénomène, des rats et des souris ont été modifiés génétiquement afin d'exprimer l'IAPP humain (Fox et al., 1993; Butler et al., 2004). Ils ont ainsi acquis la possibilité de développer la maladie et l'analyse des coupes histologiques pancréatiques a révélé la présence de plaques amyloïdes. Les mutations retrouvées au sein de la séquence primaire de l'IAPP de rongeurs semblent expliquer le caractère non amyloïdogénique et l'absence de la pathologie chez ces animaux.

**Tableau 1.2** Séquence primaire de l'IAPP chez différentes espèces.

Espèces	1	9	10	19	20	29	30	37
<b>Humain</b>	KCNTATCAT	QRLANFLVHS	SNNFGAILSS	TNVGSNTY				
<b>Rat</b>	KCNTATCAT	QRLANFLVRS	SNNLGPVLPP	TNVGSNTY				
<b>Souris</b>	KCNTATCAT	QRLANFLVRS	SNNLGPVLPP	TNVGSNTY				
<b>Singe</b>	KCNTATCAT	QRLANFLVRS	SNNFGTILSS	TNVGSNTY				
<b>Chat</b>	KCNTATCAT	QRLANFLIRS	SNNLGAILSP	TNVGSNTY				
<b>Chien</b>	KCNTATCAT	QRLANFLVRT	SNNLGAILSP	TNVGSNTY				

La présentation des séquences primaires met la région 20-29 en évidence et les résidus mutés d'une espèce à l'autre sont en rouge. Ces peptides ont également un pont disulfure entre les Cys2 et Cys7 et leur domaine C-terminal est amidé.

Le gène et la séquence primaire de l'IAPP humain ont des caractéristiques fortement intéressantes qui sont également retrouvées chez les peptides faisant partie de la famille des calcitonines (Mosselman et al., 1989; Hoppener et al., 1994). Tous les membres de cette famille comportent une séquence signal ainsi qu'une fonction C-terminale amidée en plus d'une haute homologie de séquence avec l'IAPP. Par contre, les gènes codant pour ces peptides, bien qu'ayant des séquences nucléotidiques identiques avec l'IAPP, se retrouvent sur le bras court du chromosome 11 (Hoppener et al., 1994). Certaines études semblent toutefois démontrer que le bras court du chromosome 12 serait évolutionnairement dupliqué du bras court du chromosome 11 (Craig et al., 1986), mettant d'autant plus l'IAPP en relation avec la famille des calcitonines.

Ce fut suite à ces observations que l'IAPP a été classé dans la famille des calcitonines. Ce groupe de peptides comprend quatre autres membres, soit la calcitonine (CT), les peptides reliés au gène de la calcitonine 1 et 2 (CGRPs-1/2) et l'adrénomédulline (ADM) (Wimalawansa, 1997). L'IAPP a une homologie de séquence de 46% avec les CGRPs, de 20% avec la CT et de 14% avec l'ADM (Tableau 1.3) (Westermarck et al.,

1987; Muff et al., 1999). Alors que les CGRPs sont impliqués dans la formation des os, les fonctions de la CT résident dans l'homéostasie osseuse. Quant à l'ADM, elle agirait comme vasodilatateur (Lerner, 2006). Les nombreuses similitudes structurales et génétiques entre l'IAPP et ces peptides suggèrent des fonctions semblables et des récepteurs communs.

**Tableau 1.3** Comparaison des séquences primaires des membres de la famille des calcitonines.

Séquence primaire	
<b>IAPP</b>	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY
<b>Calcitonine</b>	CGNLSTCMLGTYTQD-----FNKFHTFPQTGIVGAP
<b>CGRP-1</b>	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKAF
<b>CGRP-2</b>	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVPTNVGSKAF
<b>ADM</b>	YRQSMN NFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY

Les séquences primaires ont été alignées et les résidus identiques à ceux de l'IAPP sont marqués en rouge.

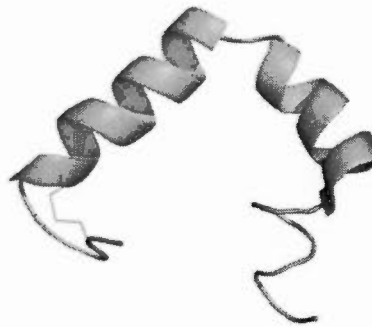
### 1.2.3 Structures secondaires de l'IAPP

L'IAPP est une hormone peptidique retrouvée principalement sous forme désordonnée. Cependant, il diffère d'une structure aléatoire absolue puisqu'il a la possibilité d'adopter différentes structures locales et ordonnées (Brender et al., 2012). La région 1 à 7 semble majoritairement désordonnée due à la contrainte conformationnelle occasionnée par le pont disulfure retrouvé entre les Cys2 et Cys7. L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) du peptide en solution montre un déplacement chimique typique d'une structure secondaire instable en hélice- $\alpha$  (Williamson et Miranker, 2007; Yonemoto et al., 2008; Soong et al., 2009). Les analyses par dichroïsme circulaire (CD) ont permis d'évaluer le contenu de cette espèce hélicoïdale

en solution à environ 10% (Knight et al., 2006). Cette conformation transitoire serait positionnée au niveau de la région N-terminale du peptide, soit entre les résidus Cys7 et Asn22 (Williamson et Miranker, 2007). Cette même conformation a également été observée en présence de certains solvants. En effet, l'hexafluoroisopropanol (HFIP) et le trifluoroéthanol (TFE), soit des solvants connus pour leur caractère inducteur d'hélice, favorisent la formation d'une hélice dans la portion N-terminale du peptide (Hubbard et al., 1991; Wang et al., 2014).

L'IAPP a également été très étudié en présence de membranes modèles et de micelles. Une étude RMN montre qu'à pH physiologique et en présence de micelles de sodium dodécyl sulfate (SDS), l'IAPP adopte une structure secondaire hélicoïdale allant des résidus Cys7 à Val17 puis de Asn21 à Ser28 (Figure 1.4) (Nanga et al., 2011). Une discontinuité formant un angle de  $85^\circ$  a été observée entre les deux hélices. Des observations semblables ont montré une hélice allant des résidus Ala5 à Ser28 en présence de micelles de SDS (Patil et al., 2009). Une discontinuité d'un angle de  $30^\circ$  était également apparente entre les acides aminés His18 et Asn22. Cependant, le domaine C-terminal de l'IAPP n'était pas amidé et le tout se déroulait à faible pH. La structure secondaire en hélice- $\alpha$  a également été observée en présence de micelles de dodécylphosphocholine (DPC). Les micelles de SDS et de DPC semblent stabiliser cette conformation (Caillon et al., 2013). Cependant, en présence de bicelles de phospholipides, l'IAPP arbore une structure en hélice- $\alpha$  transitoire qui mène ensuite vers la formation d'un feuillet- $\beta$ . C'est par l'utilisation de la résonance paramagnétique électronique (EPR) que la structure hélicoïdale a été étudiée en présence de bicelles de 80% 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-(phospho-L-sérine) (POPS) et de 20% 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC) (Apostolidou et al., 2008). L'hélice- $\alpha$  était alors retrouvée au niveau des résidus Thr9 à Asn22, la région C-terminale étant désordonnée.





**Figure 1.4** Représentation de la structure secondaire de l'IAPP en présence de micelles de sodium dodécyl sulfate à pH physiologique (PDB 2L86) (Nanga et al., 2011).

#### 1.2.4 Récepteurs et activités biologiques

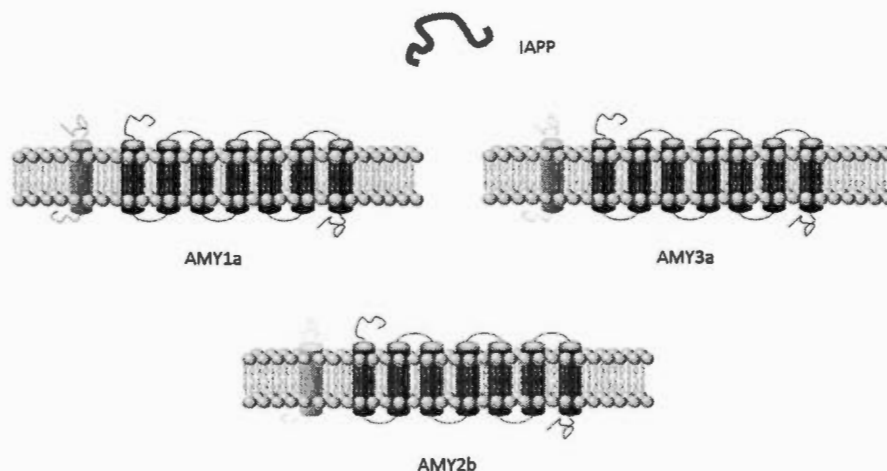
Les homologies de séquence et de structure entre l'IAPP et les autres membres de la famille des calcitonines suggèrent un récepteur commun. Ainsi, McLatchie et collègues se sont intéressés au récepteur des CGRPs dans les cellules HEK293T (McLatchie et al., 1998). Ils ont plutôt isolé un membre d'une nouvelle famille de protéines qu'ils ont nommée les protéines modifiant l'activité de récepteur (RAMP). Cette famille comprend trois membres soient les protéines RAMP1, RAMP2 et RAMP3 qui possèdent tous 148 acides aminés ainsi qu'un domaine N-terminal riche en cystéines. Bien qu'elles arborent une structure secondaire identique, soit un seul domaine transmembranaire, il semblerait que ces protéines soient retrouvées dans différents tissus. RAMP1 est localisé au niveau de l'utérus, du cerveau, du pancréas, de la vessie ainsi que du tube digestif. RAMP 2 et RAMP3 sont plutôt exprimés dans les poumons, le système immunitaire et les tissus fœtaux (McLatchie et al., 1998). Il a été démontré que le rôle des RAMPs est le contrôle du transport et de la phosphorylation de différents

récepteurs afin d'en changer le phénotype et ainsi, leur affinité pour leur ligand (Figure 1.5) (McLatchie et al., 1998; Christopoulos et al., 1999).

Bien que le CRLR (*calcitonin-receptor-like receptor*) ait la capacité de lier les CGRPs et l'adrénoméduline lorsque complexé avec RAMP1 et RAMP2-3 respectivement, aucune évidence montrant une affinité du récepteur pour l'IAPP n'a été observée (McLatchie et al., 1998). Le récepteur de la calcitonine (CTR) possède 55% d'homologie de séquence avec le CRLR dont 80% de similarité au niveau de leur domaine transmembranaire. (Christopoulos et al., 1999). Des études utilisant rIAPP sur les modèles cellulaires COS-7 et CHO-K1, transfectés avec le CTR humain et/ou les différentes RAMPs (Christopoulos et al., 1999), ont enregistré une baisse de l'affinité du CTR pour la CT. Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque l'IAPP humain était mis en contact avec des cellules endothéliales d'aorte de lapin (RAEC) (Muff et al., 1999). En effet, lorsque le récepteur se complexait avec RAMP1 ou RAMP3, il avait la possibilité d'interagir avec l'IAPP, identifiant donc le premier récepteur du peptide (Christopoulos et al., 1999; Muff et al., 1999). Deux isoformes du CTR qui diffèrent par 16 acides aminés présents (CTR1) ou absents (CTR2) dans le premier domaine transmembranaire sont retrouvées chez plusieurs espèces, dont l'humain (Nakamura et al., 1995). Il a été observé, sur des modèles cellulaires COS-7 et CHO-P, que CTR1 a la possibilité de se lier avec RAMP2 occasionnant une augmentation de l'affinité du récepteur pour l'IAPP (Tilakaratne et al., 2000). De même, une interaction entre CTR2 et RAMP1 ou RAMP3 induit un phénotype favorable à la liaison de l'IAPP (Christopoulos et al., 1999; Muff et al., 1999; Tilakaratne et al., 2000).

Ainsi, l'IAPP semble donc interagir avec trois types de récepteurs membranaires (Figure 1.5). Lorsque le CTR se lie aux différents RAMPs, on retrouve les récepteurs de l'IAPP comme étant AMY1, AMY2 et AMY3 (Hay et al., 2005). Selon la nature du CTR, on retrouve ensuite AMYa pour CTR2 et AMYb pour CTR1. De récentes études ont finalement démontré que le récepteur de l'IAPP constituait un complexe du

récepteur de la calcitonine avec les différents RAMPs et que le milieu cellulaire joue un rôle important dans la formation de ces complexes.



**Figure 1.5** Récepteurs de l'IAPP composés du récepteur de la calcitonine en association avec les différentes protéines RAMPs.

Le récepteur CTR2 est représenté en bleu alors que le CTR1 est en rouge. RAMP1, RAMP2 et RAMP3 sont représentés en orange, vert et jaune respectivement.

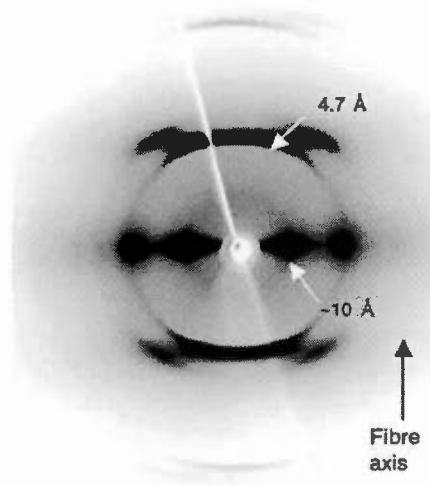
L'IAPP est sécrété suite à une stimulation des cellules- $\beta$  pancréatiques par le glucose et d'autres sécrétagogues non glycosidiques (Kahn et al., 1990). Sa concentration plasmatique normale est d'environ 4 pmol/L en état de jeûne et de 25 pmol/L après un repas (Young, 1997). Bien que ses rôles physiologiques ne soient pas encore bien compris, l'IAPP accomplirait ses fonctions biologiques dans plusieurs tissus en tant qu'hormone paracrine. Ainsi, ce peptide aurait la capacité de lier son récepteur au niveau du cerveau, plus précisément dans l'aire postrema, où il aurait un rôle sur le contrôle de la satiété et de la prise alimentaire (Sexton et al., 1994; Lutz et al., 1995). Au niveau des muscles squelettiques, l'IAPP semble avoir un impact sur la régulation du métabolisme du glycogène par l'inhibition de la sécrétion de l'insuline (Cooper et

al., 1988; Leighton et Cooper, 1988). Des souris mâles déficientes pour le gène de l'IAPP ont montré une sécrétion rapide d'insuline ainsi qu'une forte augmentation du taux de conversion de glucose (Gebre-Medhin et al., 1998). Suite à un sauvetage (*rescue*) de l'IAPP, la sécrétion de l'insuline ainsi que l'élimination du glucose sanguin étaient plus lentes. Il a également été démontré que l'IAPP a un site de liaison au niveau du cortex des reins, lui permettant d'induire une sécrétion de rénine (Wookey et al., 1996). En effet, l'injection du peptide dans des extraits de reins de rat double la concentration plasmatique de rénine (Wookey et al., 1996), alors qu'une augmentation de cinq fois est observée lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse chez l'homme (Cooper et al., 1995).

### 1.3 Fibres amyloïdes et agrégation

#### 1.3.1 Structure des fibres amyloïdes

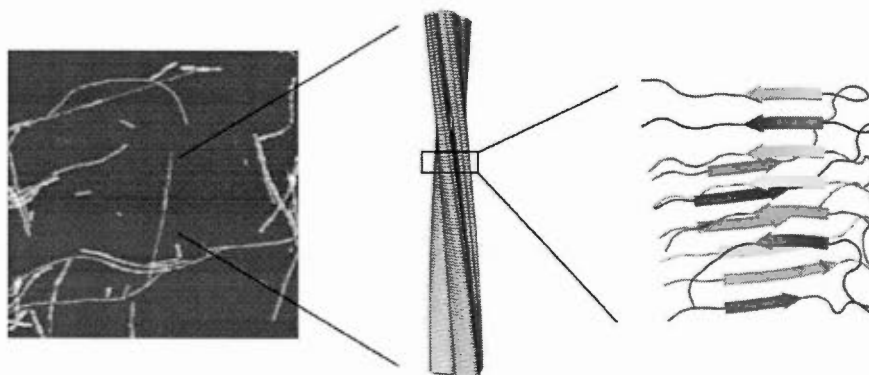
Plusieurs peptides et protéines amyloïdogéniques ont été analysés sous forme agrégée afin d'en apprendre davantage sur la structure et la morphologie des fibres amyloïdes. Des techniques telles que la diffraction aux rayons X, la microscopie électronique (TEM), la microscopie à force atomique (AFM) ainsi que la RMN sont les plus utilisées. Il semblerait que les fibres amyloïdes de nature protéique différente affichent une structure organisée et une morphologie pour le moins semblable. Par diffraction aux rayons X, la structure amyloïde a un patron de diffraction caractérisé par une réflexion de 4.7 Å dans le même sens de la fibre et par une réflexion diffuse entre 10 et 11 Å perpendiculaire au sens de la fibre (Figure 1.6) (Eanes et Glenner, 1968; Makin et Serpell, 2005).



**Figure 1.6** Patron de diffraction aux rayons X de fibres amyloïdes d'IAPP (Makin et Serpell, 2005).

Les réflexions méridionale à 4.7 Å et équatoriale à ~ 10 Å, caractéristiques d'un feuillet- $\beta$ -croisé, sont identifiées par des flèches.

Ceci suggère une structure quaternaire en feuillet- $\beta$ -croisé, caractérisée par des feuillets- $\beta$  intramoléculaires organisés perpendiculairement selon l'axe de la fibre (Figure 1.7) (Geddes et al., 1968). La microscopie électronique démontre des fibres droites, sans embranchements, d'un diamètre allant de 70 à 120 Å et de longueur variable (Makin et Serpell, 2005). De plus, les fibres amyloïdes induisent une biréfringence verte suite à une coloration au Rouge de Congo (Puchtler et Sweat, 1965) et occasionnent une augmentation de la fluorescence de la thioflavine T (ThT) (LeVine, 1993). De plus, une grande concentration de feuillets- $\beta$  est observée par CD et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Fu et al., 2015).

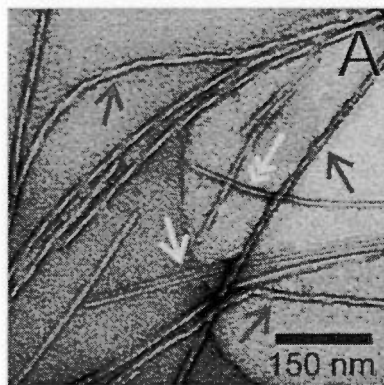


**Figure 1.7** Structure générale des fibres amyloïdes en feuillet- $\beta$ -croisé.

Les analyses de la structure agrégée de l'IAPP sont principalement effectuées par RMN et par AFM. L'IAPP, sous forme de fibres amyloïdes, partage une grande homologie de structure avec d'autres protéines amyloïdogéniques, telles que le peptide A $\beta$ . La diffraction aux rayons X montre un signal méridional de 4.7 Å, correspondant à l'espace entre deux molécules d'IAPP occupé par les ponts hydrogènes (Sumner Makin et Serpell, 2004). Un signal équatorial de 9.5 Å est observé et est caractéristique de l'espace entre deux feuillets d'une même molécule d'IAPP. Bien que le diamètre de ces fibres varie entre 50 et 100 Å, leur longueur ainsi que leurs morphologies diffèrent selon l'environnement d'autoassemblage du peptide. Bien que plusieurs modèles aient été proposés, la structure déterminée par Luca et collègues (Luca et al., 2007) semble la plus appréciée par la communauté scientifique (Figure 1.9).

En combinant des expériences d'AFM, de TEM, de RMN solide du  $^{13}\text{C}$  et de microscopie électronique à balayage (STEM), il a été observé que l'IAPP s'autoassemble sous forme de fibres amyloïdes affichant deux types de morphologies; des fibres torsadées et des fibres dites striées (Figure 1.8) (Luca et al., 2007). Les fibres torsadées sont reconnaissables par leurs régions enroulées et par leur variation de

hauteur. Pour ce qui est des fibres striées, leurs hauteurs sont identiques à celles préalablement répertoriées par Golsbury (Golsbury et al., 1999). L'analyse par STEM démontre deux épaisseurs de peptide, suggérant un autoassemblage de 2 à 4 brins de ces fibres striées. Cette observation a également été répertoriée par d'autres groupes en utilisant l'analyse STEM (Golsbury et al., 1997) et l'imagerie par AFM (Zhang et al., 2013). Une étude par RMN du  $^{13}\text{C}$  et par microscopie électronique a démontré que les fibres amyloïdes composées du peptide A $\beta$  avaient la possibilité d'adopter les deux mêmes types de morphologies que l'IAPP (Paravastu et al., 2008).

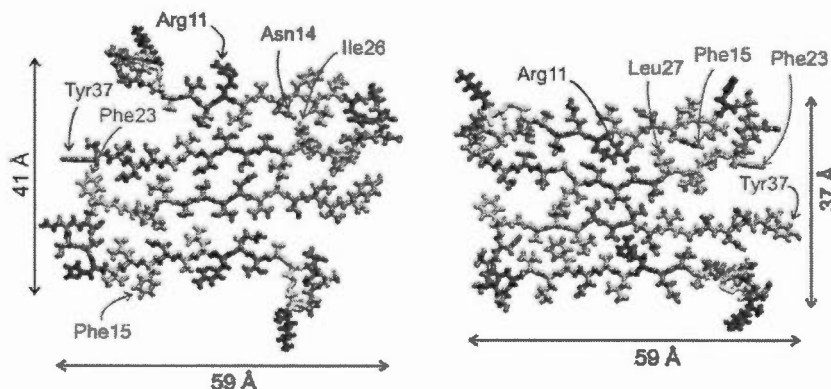


**Figure 1.8** Image des fibres d'IAPP d'une solution hétérogène par microscopie à transmission électronique (Luca et al., 2007).

Les fibres de morphologie torsadées sont identifiées par les flèches rouges alors que les fibres striées sont présentées par les flèches jaunes.

C'est par RMN du  $^{13}\text{C}$  à l'état solide que les acides aminés impliqués dans la formation de la structure en feuillet- $\beta$ -croisé ont pu être étudiés. Ainsi, les résidus 1-7 semblent désordonnés et ne feraient donc pas partie des feuillets- $\beta$ , principalement à cause de la restriction conformationnelle occasionnée par le pont disulfure. Les régions 8-17 et 28-37 forment deux brins- $\beta$  qui, ensemble, conduisent vers la formation d'un feuillet- $\beta$

parallèle (Jayasinghe et Langen, 2004; Luca et al., 2007). La région 18-27 consisterait en une boucle rattachant les deux brins.



**Figure 1.9** Modèles de fibres amyloïdes de l'islet amyloid polypeptide, proposés par Luca et collègues suite aux études de RMN au  $^{13}\text{C}$  (Luca et al., 2007). Les résidus hydrophobiques sont représentés en vert, les acides aminés polaires en magenta, les résidus chargés positivement en bleu et finalement, les deux Cys impliquées dans le pont disulfure sont colorées en jaune.

D'autres modèles de structures quaternaires ont été proposés pour l'IAPP. Ce fut grâce à une analyse de la séquence primaire du peptide ainsi qu'à des données expérimentales que le modèle serpentini- $\beta$  a été présenté par Kajava et collègues (Kajava et al., 2005). Cette structure comprend trois brins- $\beta$  aux régions 12-17, 22-27 et 31-37, chacune séparée par des coudes. Un autre modèle, ressemblant à celui présenté par Luca et collègues, a été proposé suite à des expérimentations par résonance paramagnétique électronique (Bedrood et al., 2012). Celui-ci montre deux brins- $\beta$  qui, ensemble, forment un feuillet- $\beta$  typique des autres études. Le segment 7-10 servirait de transition pour la formation des brins- $\beta$ , en position 12-19 et 31-36. Cependant, la distance entre les deux brins- $\beta$  n'est pas conséquente avec l'étude de Lucas (Luca et al., 2007). En



effet, 15 Å séparerait les brins, occasionnant un enroulement typique des fibres torsadées préalablement décrites .

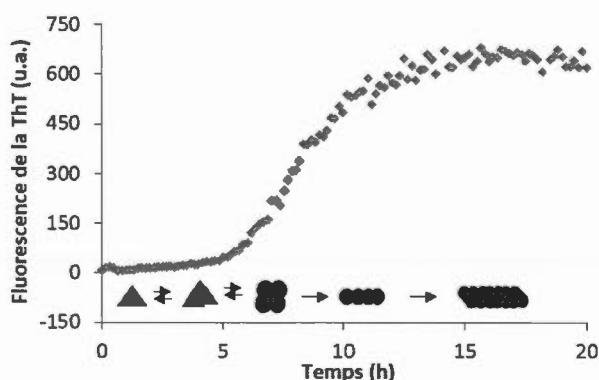
### 1.3.2 Mécanismes de formation de fibres amyloïdes

La conformation native de la protéine ou du peptide amyloïdogénique sous sa forme soluble a son importance dans le processus de formation de fibres amyloïdes. Ils peuvent être séparés en deux grandes classes structurales; les protéines globulaires et les protéines intrinsèquement désordonnées (Linding et al., 2004). La première classe comprend les protéines qui affichent une structure hautement organisée à leur état natif. Celles-ci doivent se dénaturer ou se déplier, au moins partiellement, afin d'enclencher le processus de formation de fibres amyloïdes. C'est entre autre le cas pour la transthyrétine, une protéine plasmique homotétramérique dont l'agrégation est associée à plusieurs formes d'amyloïdoses (Johnson et al., 2012). Au contraire, les protéines intrinsèquement désordonnées doivent subir un réarrangement conformationnel et adopter une ou plusieurs structures localement ordonnées afin d'enclencher le processus amyloïdogénique (Linding et al., 2004). Le peptide A $\beta$  et l'IAPP font partie de cette dernière classe.

Le ou les mécanismes de formation de fibres amyloïdes par les protéines ou les peptides amyloïdogéniques restent encore aujourd'hui incompris et constituent toujours un sujet d'actualité. La formation de fibres amyloïdes *in vitro* est généralement suivie en mesurant la fluorescence de la ThT. Ce fluorophore est une petite molécule qui se lie spécifiquement à la structure quaternaire des fibres, menant à l'augmentation de sa fluorescence. Plusieurs groupes de recherche ont étudié les différents mécanismes amyloïdogéniques possibles grâce à cette méthode ainsi que par des techniques de RMN, d'AFM, de TEM et d'approches spectroscopiques variées. Quatre principaux

modèles ont été suggérés, dont l'assemblage par modèle et la conversion dirigée par le monomère (Kelly, 2000; Serio et al., 2000; Lee et al., 2011).

Le mécanisme de formation de fibres amyloïdes par l'IAPP le plus souvent évoqué est la polymérisation nucléation-dépendante qui comprend trois phases (Figure 1.10) (Kelly, 2000). La première est la phase de latence au cours de laquelle on retrouve principalement des monomères et des oligomères en échange rapide. Lorsque des oligomères compétents à la nucléation forment un noyau, la phase d'élongation est enclenchée. Elle est caractérisée par l'allongement rapide des protofibrilles par l'addition de monomères compétents à leurs extrémités de croissance. Un plateau est ensuite atteint lorsqu'il y a présence de fibres amyloïdes matures.



**Figure 1.10** Courbe de formation de fibres amyloïdes de l'islet amyloid polypeptide par polymérisation nucléation-dépendante.

L'IAPP<sub>20-29</sub> a d'ailleurs été étudié par *time-lapse* AFM, permettant l'observation des différentes espèces du processus de formation de fibres amyloïdes (Zhang et al., 2013). Lors de la phase de latence, de petites particules ainsi que de longs et minces brins étaient visibles. La phase d'élongation comportait de nombreux rubans de longueur croissant. Lorsque le plateau est atteint, deux espèces coexistaient, soient les fibres torsadées et les fibres lisses (Zhang et al., 2013), s'apparentant aux fibres observées par Luca et collègues (Luca et al., 2007).

Le mécanisme et la cinétique de formation de fibres amyloïdes par l'IAPP peuvent être modulés par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la concentration en peptide est critique. En effet, le processus amyloïdogénique est concentration dépendante (Kudva et al., 1998). Plus la concentration en peptide est élevée, plus la phase de latence est courte et plus la quantité de fibres formées augmente. Or, à l'intérieur des vésicules de sécrétion, l'IAPP est retrouvé en forte concentration (0.8 à 4 mM) (Susa et al., 2014) bien qu'il ne semble pas former de fibres amyloïdes. Cette inhibition de l'amyloïdogénèse est probablement due à un autre facteur, le pH. Il a été observé qu'à faible pH l'IAPP ne formait pas de fibres amyloïdes, contrairement à pH plus élevé (Charge et al., 1995). En milieu vésiculaire, donc à pH 5.5, l'histidine en position 18 retrouvée au niveau du coude de la fibre amyloïde est alors protonée et empêcherait la formation de feuillet- $\beta$  (Abedini et Raleigh, 2005; De Carufel et al., 2013). Plusieurs autres facteurs, tels que des biomolécules et des métaux, ont un impact dans la formation de fibres amyloïdes et seront discutés plus bas.

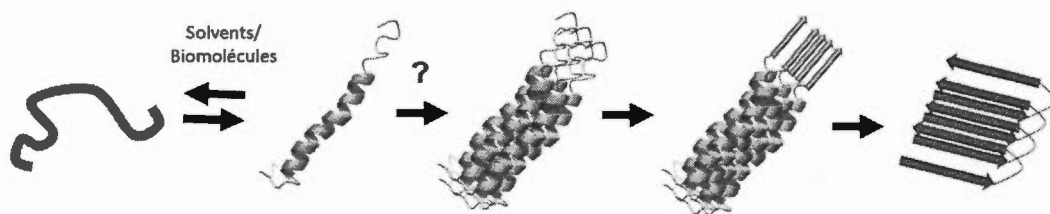
### 1.3.3 Implications des espèces intermédiaires; l'épingle- $\beta$ et l'hélice- $\alpha$

Bien que les mécanismes de formation de fibres amyloïdes soient grandement étudiés, ils restent encore peu compris. La nature des espèces peuplant la phase de latence et les changements conformationnels impliqués dans la formation du noyau sont des sujets controversés. La population scientifique est en désaccord concernant l'espèce critique initiant le processus d'assemblage de l'IAPP. En effet, il existe deux principales hypothèses impliquant deux structures secondaires différentes; l'épingle- $\beta$  et l'hélice- $\alpha$ .

La première hypothèse implique l'importance de l'épingle- $\beta$  ( *$\beta$ -hairpin*) comme espèce préliminaire dans l'amyloïdogénèse. C'est en combinant la spectroscopie de masse par mobilité d'ions et la dynamique moléculaire *in silico* par échange de *replica* que deux

espèces monomériques ont été observées (Dupuis et al., 2009). En effet, une espèce riche en hélices- $\alpha$  et une autre en épingle- $\beta$ , le ratio de cette dernière augmentant avec le pH. Or, les mêmes analyses faites avec l'IAPP de rat ne montrent qu'une seule espèce sous forme d'hélice- $\alpha$ . Ceci suggère l'importance de la structure en épingle- $\beta$  dans l'amyloïdogénèse et la cytotoxicité de l'IAPP. Ainsi, Dupuis et collègues suggèrent, en accord avec l'accélération de l'amyloïdogénèse à pH physiologique (Abedini et Raleigh, 2005; De Carufel et al., 2013), que les monomères d'IAPP adoptent une conformation en épingle- $\beta$  afin de débiter leur oligomérisation. Cette conformation comprendrait les résidus 9 à 17 et 24 à 33 en brins- $\beta$  alors que les acides aminés 18 à 23 formeraient un coude. Une étude impliquant de la spectroscopie infrarouge 2D est arrivée à la même théorie, précisant toutefois que les liaisons hydrogènes avaient lieu entre les épingle- $\beta$  afin d'attacher ces monomères et mener vers la formation de fibres amyloïdes matures (Shim et al., 2009). Ainsi, l'épingle- $\beta$  semble être un intermédiaire important de la formation de fibres amyloïdes.

Cependant, en présence de certains solvants, tels l'HFIP et le TFE (Hubbard et al., 1991; Wang et al., 2014), ainsi que plusieurs composantes anioniques de la membrane plasmique, l'IAPP a la possibilité d'adopter une structure secondaire en hélice- $\alpha$  (Knight et al., 2006; De Carufel et al., 2013). Plusieurs études se sont donc intéressées à l'implication de cet intermédiaire hélicoïdal dans l'amyloïdogénèse de l'IAPP. Il a été observé que l'IAPP 1-19 adoptait non seulement une hélice- $\alpha$  en présence de membranes modèles, mais que cette structure était principalement responsable de la perturbation membranaire causée par l'IAPP (Engel et al., 2006; Brender et al., 2008). Aucune formation de fibres amyloïdes par ce segment n'a été détectée par ThT bien que ce monomère soit facilement incorporé dans les membranes (Engel et al., 2006; Brender et al., 2008). Ceci suggère que l'intermédiaire hélicoïdal serait impliqué dans la dégénérescence cellulaire observée chez les patients atteints du diabète de type II en plus d'induire une certaine proximité entre les monomères attachés à la membrane. Un mécanisme a donc été proposé en lien avec ces observations (Figure 1.11).



**Figure 1.11** Représentation du mécanisme d'amyloïdogénèse proposé en présence de biomolécules anioniques ou de solvants et impliquant l'intermédiaire hélicoïdal.

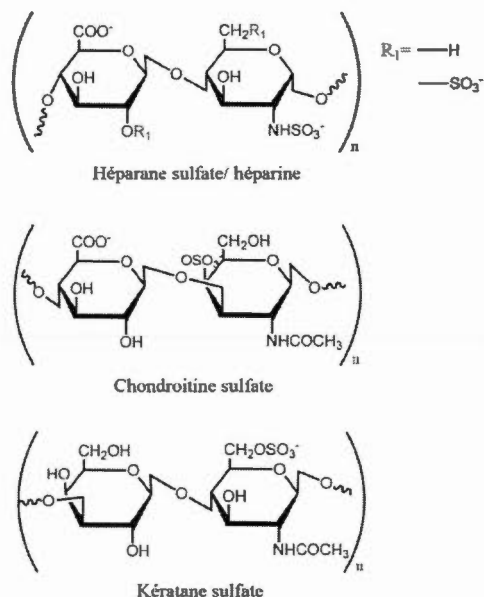
Ainsi, l'IAPP sous forme désordonnée adopterait une structure en hélice- $\alpha$  en présence d'un environnement mimant la membrane plasmique, principalement au niveau de la région Thr9 à Asn22 (Apostolidou et al., 2008). Ce monomère hélicoïdal engendrerait une rapide oligomérisation, menant à une forte concentration locale du segment hydrophobe du peptide. Un changement conformationnel rapide de cette région vers un feuillet- $\beta$  se produirait, déstabilisant l'hélice- $\alpha$ . La fragilisation de cette structure secondaire permettrait au feuillet- $\beta$  de se répandre tout au long du peptide, formant ainsi des fibres amyloïdes (Abedini et Raleigh, 2009).

#### 1.3.4 Rôles des cofacteurs

Les dépôts amyloïdes sont retrouvés au niveau de la matrice extracellulaire et à la surface membranaire. Or, la membrane plasmique est un milieu fortement hétérogène et comprend des molécules de toutes sortes. Il a été observé que les fibres amyloïdes étaient en association avec plusieurs de ces composés et que ceux-ci seraient impliqués dans le processus amyloïdogénique.

Les GAGs sont de longs polysaccharides sulfatés retrouvés principalement à la surface externe de la membrane plasmique ainsi que dans le milieu extracellulaire. Plusieurs

classes de GAGs ont été répertoriées et ont été divisées selon leur nature. On retrouve entre autres l'héparane sulfate, les chondroïtines sulfates, les dermatines sulfates, la kératine sulfate et l'acide hyaluronique (Figure 1.12). Ce sont les composantes anioniques majeures de la membrane plasmique. L'héparine est un modèle de GAGs, mimant la région sulfatée de l'héparane sulfate, qui est grandement utilisée dans les études mécanistiques. Il a été démontré que ces biomolécules anioniques sont en association avec les dépôts amyloïdes (Ancsin, 2003) dont ceux composés de transthyrétine (Magnus et al., 1991), du peptide A $\beta$  (DeWitt et al., 1993) et d'IAPP (Ehrlich et Ratner, 1961; Young et al., 1992).



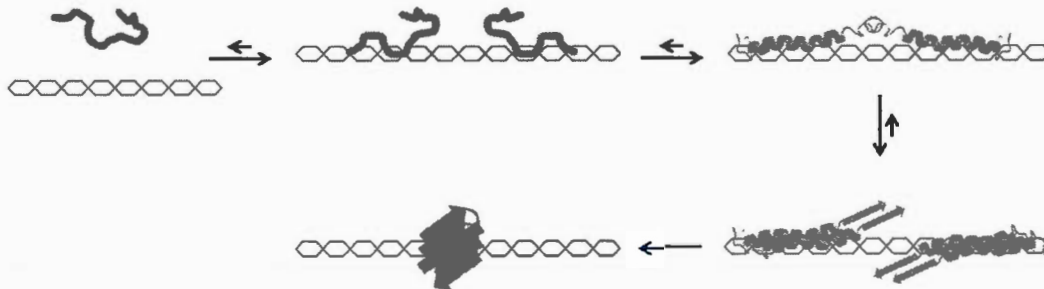
**Figure 1.12** Structures des glycosaminoglycans.

Afin d'étudier l'impact des GAGs dans la formation de fibres amyloïdes, des îlots transgéniques de souris exprimant l'IAPP humain ont été traités avec WAS-406, un inhibiteur de synthèse de l'héparane sulfate (Hull et al., 2007). Une réduction concentration dépendante de dépôts amyloïdes et un épanouissement des îlots transgéniques ont été observés, démontrant l'implication des GAGs dans

l'amyloïdogenèse. Un suivi de la fluorescence de la ThT et du Rouge de Congo ainsi que l'imagerie par microscopie électronique ont montré que l'héparane sulfate et l'héparine induisent une forte accélération du processus amyloïdogénique (Castillo et al., 1998; De Carufel et al., 2013). L'héparine a également un effet protecteur contre la toxicité induite par l'IAPP sur des cellules  $\beta$ -pancréatiques et ce, de façon concentration dépendante (De Carufel et al., 2013). Cette observation contradictoire s'expliquerait par le fait qu'en présence de GAGs, l'IAPP forme rapidement des fibres qui sont non toxiques pour les cellules  $\beta$ -pancréatiques.

Ainsi, nous avons récemment proposé un mécanisme concernant l'effet pro-amyloïdogénique des GAGs sulfatés (Annexe 1). Considérant la charge négative des GAGs et la charge nette de +3 de l'IAPP à pH physiologique, il semblerait qu'une interaction électrostatique soit favorisée entre les deux molécules. En effet, une analyse du complexe par RMN montre que l'héparine lierait la région N-terminale du peptide ainsi que son propeptide (Jha et al., 2011). De plus, il a été observé par titrage calorimétrique isotherme (ITC) qu'à pH 5.5, environ 32 molécules d'IAPP avaient la possibilité de lier une molécule d'héparine de 17 kDa (De Carufel et al., 2013). Une enthalpie ( $\Delta H$ ) de -4.3 kcal/mol ainsi qu'une constante d'affinité ( $K_a$ ) de  $7.08 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  ont également été enregistrés. Or, lorsque l'on élève le pH à 7.5, l'histidine en position 18 se déprotonne et l'affinité entre les deux molécules diminue drastiquement, la constante d'affinité ( $K_a$ ) et l'enthalpie ( $\Delta H$ ) chutant à  $3.63 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  et à -1.6 kcal/mol respectivement. Une conformation transitoire en hélice- $\alpha$  a également été observée par dichroïsme circulaire lorsque l'IAPP se lie à l'héparine. Ainsi, il semblerait que l'IAPP, par sa région N-terminale cationique, se lie à la région anionique des GAGs, induisant un changement conformationnel de l'IAPP vers une hélice- $\alpha$  entre les résidus 9 et 22 (Figure 1.13). Cette liaison mène à une forte concentration locale d'IAPP sur les GAGs, causant l'association de la région hydrophobique 20-29 des molécules d'IAPP. Un changement conformationnel de ce segment vers un feuillet- $\beta$  favoriserait la formation de fibres amyloïdes. Ce mécanisme suggère fortement l'implication d'un intermédiaire

hélicoïdal lors de l'amyloïdogenèse de l'IAPP (Figure 1.11). Des mécanismes semblables, basés sur un échafaudage des GAGs, ont été proposés chez d'autres protéines amyloïdogéniques (Motamedi-Shad et al., 2009; Bourgault et al., 2011).

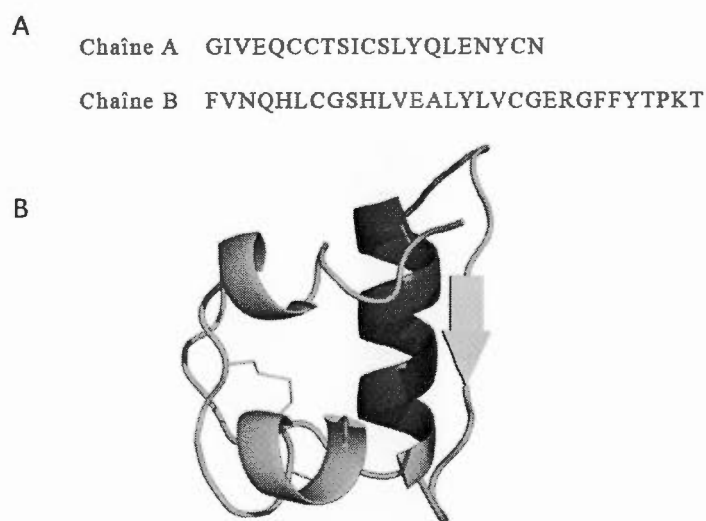


**Figure 1.13** Représentation du mécanisme proposé pour la formation de fibres amyloïdes de l'IAPP en présence de glycosaminoglycans (De Carufel et al., 2013).

Bien qu'entreposé à l'intérieur des vésicules de sécrétion à très haute concentration (0.8 à 4 mM) (Susa et al., 2014), l'IAPP ne s'agrège pas. De nombreuses études ont démontré que l'insuline et le pH acide des vésicules sont responsables de ce phénomène. Suite à des expérimentations *in vitro*, aucun matériel amyloïde n'a été détecté par Rouge de Congo et par microscopie électronique en présence de diverses concentrations d'insuline (Westermarck et al., 1996). Plusieurs groupes de recherche se sont ensuite intéressés au mécanisme d'inhibition de l'insuline. Ce peptide est composé de deux courtes chaînes peptidiques (chaîne A et B) reliées par deux ponts disulfures (Figure 1.14). En étudiant le potentiel inhibiteur de ces chaînes par la fluorescence de la ThT, par CD et par *peptide array*, il a été observé que la chaîne B est responsable de l'activité inhibitrice de l'insuline (Gilead et al., 2006). Plus précisément, la région hélicoïdale 9-20 de l'insuline se lierait au segment 7-19 de l'IAPP, le restreignant sous sa forme désordonnée. Ce mécanisme serait basé sur l'homologie de séquence entre le segment impliqué de l'insuline et de l'IAPP ainsi que par les interactions entre les



résidus aromatiques. Alors que plusieurs études semblent s'entendre sur l'action de l'insuline lors de la phase de latence (Gilead et al., 2006; Susa et al., 2014), d'autres proposent une action au niveau de la phase d'élongation (Larson et Miranker, 2004).



**Figure 1.14** Structure de l'insuline (PDB 1ZNI) (Bentley et al., 1976).

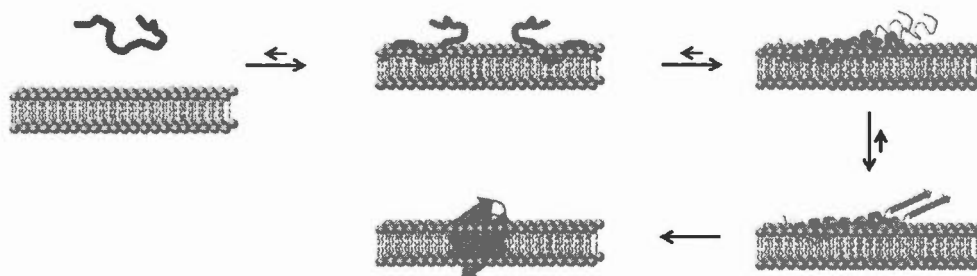
(A) La séquence primaire de l'insuline est séparée entre les deux chaînes la composant.  
 (B) Représentation de la structure secondaire de l'insuline observée par diffraction aux rayons X. Les résidus impliqués dans la liaison avec l'IAPP sont représentés en rouge.

Plusieurs métaux sont également reconnus pour leur fonction dans l'amyloïdogenèse de plusieurs peptides et protéines, tels que le peptide A $\beta$  et l' $\alpha$ -syn (Uversky et al., 2001; Huang et al., 2004; Yamin et al., 2005; Talmard et al., 2007). Il semblerait que ces peptides aient un site de liaison aux métaux divalents, permettant au magnésium, au calcium et au cuivre de se fixer aux fibres amyloïdes et de moduler la phase d'élongation. Bien que le zinc ait un impact sur la formation de fibres amyloïdes de

l'IAPP, aucun site de liaison pour ions divalents n'a été répertorié à ce jour chez le du peptide (Brender et al., 2010; Salamekh et al., 2011).

Ainsi, bien que chacune des composantes des vésicules de sécrétion ait son propre impact dans la formation de fibres amyloïdes de l'IAPP, leur combinaison préviendrait l'enclenchement du processus.

Les protéines et peptides amyloïdogéniques sont également en association avec les lipides de la membrane plasmique. Ceux-ci semblent avoir un rôle important dans la régulation de la formation de fibres amyloïdes. Comme mentionné plus haut, au contact de bicelles de phospholipides, l'IAPP adopte une structure transitoire sous forme d'hélice- $\alpha$ , principalement entre les résidus Thr9 et Asn22 (Apostolidou et al., 2008). Un changement conformationnel est ensuite observé, passant de cette hélice vers une structure riche en feuillets- $\beta$  caractéristique des amyloïdes. Le suivi de la cinétique d'agrégation par la fluorescence de la ThT a démontré que l'amyloïdogénèse de l'IAPP était fortement accélérée en présence de membranes modèles (Knight et Miranker, 2004; Sparr et al., 2004; Relini et al., 2009; Caillon et al., 2013). Le processus amyloïdogénique de l'IAPP est également modulé selon la nature de la tête hydrophile des phospholipides (Caillon et al., 2013). En effet, la présence de lipides zwitterioniques, tels que le 1,2-dioleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DOPC), ralentit la formation de fibres amyloïdes. Au contraire, au contact de phospholipides anioniques, le processus amyloïdogénique de l'IAPP est accéléré. Il a été suggéré que l'hélice- $\alpha$  transitoire observée au contact de l'IAPP avec les membranes modèles serait impliquée dans la formation de fibres amyloïdes, probablement par un mécanisme semblable à celui mentionné plus haut (Figure 1.15).



**Figure 1.15** Représentation du mécanisme proposé pour la formation de fibres amyloïdes de l'IAPP en présence de membranes modèles (Knight et al., 2006).

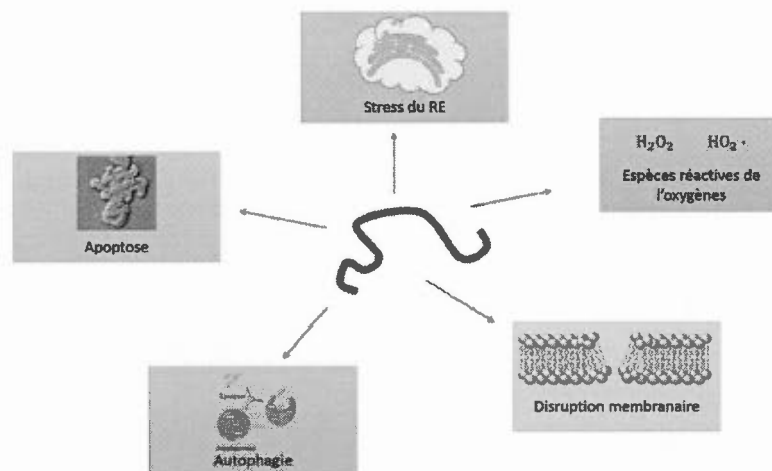
Ainsi, au contact de membranes modèles, l'IAPP adopterait une conformation en hélice- $\alpha$  au niveau de la région N-terminale, principalement par des interactions électrostatiques (Knight et al., 2006). Une portion de cette hélice serait également encrée dans la membrane, facilitant les interactions entre les molécules d'IAPP. Ces interactions permettraient l'oligomérisation du peptide sous forme hélicoïdale. Cette augmentation de la concentration locale d'IAPP faciliterait un changement conformationnel au niveau de la région C-terminale du peptide vers un feuillet- $\beta$ . Cette conversion mènerait à la propagation du feuillet- $\beta$  jusqu'à la formation de fibres amyloïdes matures (Knight et al., 2006; Williamson et al., 2009).

## 1.4 Cytotoxicité de l'IAPP

### 1.4.1 Espèces cytotoxiques

La présence de dépôts amyloïdes au niveau du pancréas chez les patients atteints du diabète de type II a longtemps mené à considérer les fibres amyloïdes comme étant la cause directe de la dégénérescence cellulaire, principalement due à leur colocalisation

(Janciauskiene et Ahren, 2000). Cette hypothèse était appuyée par les études de Lorenzo et collègues qui ont démontré le potentiel cytotoxique des fibres amyloïdes sur des cellules humaines et de rongeurs (Lorenzo et al., 1994). Cependant, plusieurs autres observations ont été faites depuis et il semble que les petits agrégats préfibrillaires soient à l'origine de cette cytotoxicité aggravant la pathologie du diabète de type II. En 2006, une étude utilisant la rifampicine, un inhibiteur du processus de formation de fibres amyloïdes, a montré que malgré l'inhibition de l'amyloïdogenèse de l'IAPP, la viabilité des cellules pancréatiques était toujours diminuée (Meier et al., 2006). Par la suite, des souris transgéniques comportant le gène de l'IAPP humain ont été produites. De petits agrégats amorphes étaient observés au moment de la mort cellulaire, et ce, malgré l'absence de dépôts amyloïdes (Janson et al., 1996). Ainsi ces résultats appuient l'hypothèse d'une espèce cytotoxique préfibrillaire. Bram et collègues ont récemment isolé des anticorps de patients souffrant de diabète de type II afin d'en tester leur reconnaissance sur les différentes espèces d'IAPP, soit le monomère, les oligomères et les fibres matures (Bram et al., 2014). Ces anticorps semblaient spécifiques aux oligomères et inhibaient la mort cellulaire occasionnée par la toxicité du peptide, appuyant les dernières études. Considérant tous ces nouveaux faits, la communauté scientifique s'entend sur l'hypothèse selon laquelle les petits agrégats intermédiaires de la formation de fibres amyloïdes seraient l'espèce toxique causant la mort des cellules  $\beta$ -pancréatiques, et ce, chez plusieurs maladies de type amyloïde (Ladiwala et al., 2011). Le mécanisme par lequel ces espèces engendrent la dégénérescence des cellules n'est toujours pas bien compris malgré les nombreuses études effectuées à ce sujet qui seront discutées ci-bas (Figure 1.16).



**Figure 1.16** Résumé des effets cytotoxiques induits par l'IAPP.

Bien que plusieurs autres effets soient étudiés, ceux représentés ici témoignent de ceux discutés plus bas.

#### 1.4.2 Cytotoxicité induite par la perméabilisation membranaire

Le mécanisme le plus étudié et le plus appuyé est la perturbation membranaire. Bien que des études montrent un dépôt d'intermédiaires de petites tailles à la surface membranaire, l'hypothèse la plus appréciée semble être celle par laquelle l'IAPP induit une cytotoxicité par la formation de pores ressemblant à des canaux (*channel-like*). Par sa charge nette positive, l'IAPP interagit préférentiellement avec les lipides anioniques, bien que la composition lipidique membranaire influence son agrégation (Caillon et al., 2013). Une étude utilisant des bicouches membranaires planaires de phospholipides a montré une dépolarisation membranaire causée par un influx de cations intracellulaires (Mirzabekov et al., 1996). Ceci suggère que l'IAPP forme des pores ressemblant à des canaux ioniques, dont sa charge dirige le flux ionique. La formation de ces « canaux » peut causer une dysfonction des pompes biologiques, menant à un dérèglement de l'équilibre ionique et ultimement, à l'apoptose (Fawthrop et al., 1991). La perturbation

membranaire a également été observée par microscopie électronique lorsque les cellules étaient en contact avec des agrégats d'IAPP et des fibres amyloïdes (Janson et al., 1999). En présence d'oligomères, de petites vésicules interagissant avec l'IAPP étaient apparentes, ce qui n'était pas le cas avec les fibres matures. Ceci suggère un bris de la membrane plasmique par le processus de formation de fibres amyloïdes.

#### 1.4.3 Rôle des voies apoptotiques

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme impliquant plusieurs événements, telle l'expression de la protéine p53, une hausse de calcium intracellulaire ainsi que l'activation de diverses caspases. Il semblerait que l'IAPP utilise la cascade apoptotique afin d'induire la dégénérescence des cellules  $\beta$ -pancréatiques chez les patients atteints du diabète de type II. Comme mentionné plus haut, la formation de canaux non spécifiques par l'IAPP cause un influx de calcium intracellulaire ayant la capacité de déclencher l'apoptose (Fawthrop et al., 1991; Orrenius et al., 1992). La fragmentation de l'ADN, une caractéristique importante du processus apoptotique, a été observée chez des cellules RINm5f traitées avec l'IAPP (Zhang et al., 1999). De plus, l'IAPP semble induire l'expression de p53, un gène suppresseur de tumeur bien connu, ayant la possibilité d'arrêter le cycle cellulaire et d'augmenter le niveau de transcription de facteurs pro-apoptotiques (Zhang et al., 1999; Mlynarczyk et Fahraeus, 2014). De même, p21, un inhibiteur du cycle G1, semblerait être un gène surexprimé au sein des cellules lorsque celles-ci sont en contact avec des agrégats d'IAPP (Zhang et al., 1999). Toutes ces études semblent démontrer que les oligomères profibrillaires de l'IAPP mènent à l'apoptose par un mécanisme non spécifique. Toutefois, Park et collègues ont observé une surexpression du récepteur FAS (aussi connu comme APO-1 ou CD95), une protéine transmembranaire capable de déclencher la mort cellulaire programmée lorsque l'IAPP est en contact avec des cellules d'îlots de Langerhans

(Park et al., 2012). Cette hausse de l'expression du récepteur mène à une sur-activation des caspases-3. À l'opposé, des cellules  $\beta$ -pancréatiques déficientes en récepteur FAS ont montré une résistance face à la cytotoxicité induite par le peptide (Park et al., 2012). Une colocalisation entre les récepteurs FAS et le site de formation de fibres amyloïdes a également été observée (Westwell-Roper et al., 2011; Park et al., 2012). Ainsi, l'IAPP semble induire l'apoptose par divers mécanismes. Un nombre important d'études ont été effectuées sur le sujet avec d'autres peptides amyloïdogéniques, tels que le peptide A $\beta$ , et des résultats semblables ont été obtenus (Halle et al., 2008).

#### 1.4.4 Cytotoxicité par les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre de la prise en charge des radicaux libres, conduisant à une augmentation de la concentration d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une augmentation du niveau de ROS a été observée lorsque des îlots de rats possédant le gène de l'IAPP humain ainsi que des cellules pancréatiques étaient traités avec l'IAPP (Li et al., 2009; Zraika et al., 2009). Plusieurs études se sont donc concentrées sur l'impact de molécules antioxydantes sur les processus amyloïdogénique et cytotoxique de l'IAPP. Ainsi, la présence de phycocyanine, une molécule naturelle ayant des propriétés antioxydantes, protège les cellules  $\beta$ -pancréatiques contre la toxicité induite par l'IAPP en réduisant le niveau de ROS et en modulant les voies apoptotiques (Li et al., 2009). De même, l'inhibition de l'amyloïdogénèse par un traitement au Rouge de Congo et au WAS-406, restaure la viabilité des îlots pancréatiques et diminue le niveau de ROS (Zraika et al., 2009). Au contraire, la présence de N-acétyl-L-cystéine (NAC) réduit le niveau de ROS sans toutefois inhiber l'amyloïdogénèse et la toxicité causées par l'IAPP (Konarkowska et al., 2005; Zraika et al., 2009). Il est suggéré que le stress oxydatif n'induirait pas la mort cellulaire à court terme. Cependant, à moyen-long terme, ce mécanisme serait en

coopération avec l'apoptose. L'impact du stress oxydatif sur la viabilité cellulaire a également été étudié chez d'autres peptides amyloïdogéniques tels que le peptide A $\beta$  et les chaînes légères d'anticorps (Brenner et al., 2004; Placido et al., 2015).

#### 1.4.5 Induction du stress du réticulum endoplasmique

La résistance à l'insuline au niveau périphérique retrouvée chez les patients atteints du diabète de type II mène à une augmentation de l'expression de l'insuline et de l'IAPP, passant d'un ratio 1 :100 à 1 :20 dans les vésicules de sécrétion (Gedulin et al., 1991). Le réticulum endoplasmique (RE) est alors surmené par cette augmentation de protéines en transit, occasionnant un stress de l'organelle et une diminution de son efficacité. Afin de redresser l'équilibre protéique face à de nombreuses protéines incapables d'adopter un repliement adéquat, le système de réponse aux protéines désordonnées (UPR) est activé. Huang et collègues ont démontré une augmentation des protéines de sauvetage par le système UPR chez un modèle de souris surexprimant l'IAPP (Huang et al., 2007). Cette induction du stress du RE menait à la dégénérescence des cellules- $\beta$  par activation de l'apoptose. Or, chez des souris transgéniques surexprimant l'IAPP de souris, aucun signe de stress du RE menant à la mort cellulaire n'a été observé. L'IAPP de souris ne formant pas de fibres amyloïdes, ces résultats suggèrent l'activation du stress du RE par le processus amyloïdogénique plutôt que la surexpression de protéines (Huang et al., 2007).

#### 1.4.6 Implication de l'autophagie

Malgré le fait que l'autophagie suit un mécanisme de protection des cellules contre des agents toxiques, il peut également causer la mort cellulaire. Il a été démontré que



lorsqu'en contact avec des agrégats d'IAPP, les cellules enclenchent l'autophagie. Shigihara et collègues ont inhibé l'activation de l'autophagie chez des cellules de souris transgéniques et ont observé une augmentation de la toxicité de l'IAPP (Shigihara et al., 2014). De plus, les agrégats d'IAPP menaient à la perturbation des autophagosomes, menant à l'apoptose.

Ainsi, la formation de fibres amyloïdes semble induire la mort cellulaire par divers mécanismes de cytotoxicité. Bien que chacun de ceux-ci aient été étudiés séparément, il est indéniable que plusieurs de ces mécanismes fonctionnent de façon coopérative.



## CHAPITRE II

### PROBLÉMATIQUE ET SUJET D'ÉTUDE

L'IAPP est sécrété par les cellules  $\beta$ -pancréatiques sous forme désordonnée. Cependant, d'autres structures secondaires locales ont été répertoriées chez cette hormone peptidique. En milieu mimant la membrane plasmique, l'IAPP arbore une conformation en hélice- $\alpha$  principalement entre les résidus 9 et 22. Cette structure secondaire avait déjà été répertoriée par plusieurs groupes, non seulement pour l'IAPP, mais également pour d'autres peptides et protéines amyloïdogéniques intrinsèquement désordonnés, tels le peptide A $\beta$  et l' $\alpha$ -syn. Lors de nos études précédentes, nous avons observé, en présence d'héparine, une accélération de l'amyloïdogénèse de l'IAPP ainsi que la formation d'une hélice- $\alpha$  transitoire (Annexe A). Malgré tout, il nous était impossible de postuler si cet intermédiaire hélicoïdal faisait partie de la cascade amyloïdogénique de l'IAPP. Plusieurs études ont cependant conclu que cette conformation était importante lors de la formation de fibres amyloïdes, principalement lors des événements précoces de ce processus.

Un mécanisme d'action de cet intermédiaire a d'ailleurs été émis. Ainsi, au contact de bicouches lipidiques, l'IAPP passerait d'une conformation désordonnée vers une hélice- $\alpha$ . Ce changement conformationnel serait thermodynamiquement relié à l'oligomérisation des monomères, menant à une forte concentration locale du segment hydrophobique du peptide. Cet assemblage intermoléculaire occasionnerait un réarrangement conformationnel en feuillet- $\beta$  de la région C-terminale. L'hélice- $\alpha$  serait alors déstabilisée et permettrait au feuillet- $\beta$  de se répandre tout au long du peptide,

formant ainsi une structure quaternaire en feuillet- $\beta$ -croisé (Abedini et Raleigh, 2009). Cet intermédiaire hélicoïdal aurait également un grand rôle dans la toxicité du peptide. Il a été observé que la portion hélicoïdale de l'IAPP s'insérait dans les membranes, causant de ce fait une perturbation membranaire. Cette perturbation de la membrane pourrait être également associée au diabète de type II, puisque qu'une dégénérescence des cellules  $\beta$ -pancréatiques est observée chez les patients atteints de cette pathologie. Ainsi, cette conformation secondaire transitoire semble avoir de grands impacts au niveau de l'amyloïdogénèse et de la cytotoxicité de l'IAPP.

Les études qui se sont concentrées sur l'impact de l'hélice- $\alpha$  ont utilisé des fragments du domaine N-terminal de l'IAPP ou ont fait appel à diverses approches, telles que de petites molécules, afin de stabiliser le domaine hélicoïdal du peptide. Or, sans l'IAPP complet, il est difficile d'appliquer les observations sur un modèle *in vivo*. De plus, il semble très difficile de déterminer si cet intermédiaire hélicoïdal est « *on* » ou « *off-pathway* » dans la formation de fibres amyloïdes. Le rôle de cette structure secondaire dans la toxicité du peptide sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques reste également inconnu. Finalement, les techniques spectroscopiques actuelles et classiques ne permettent pas de résoudre facilement la question de la voie amyloïdogénique. En effet, les intermédiaires structuraux étant transitoires, il est difficile de les stabiliser suffisamment longtemps pour les étudier sans modifier le processus d'autoassemblage. Une autre stratégie doit être employée afin de résoudre ces questions.

## 2.1 Hypothèse

Afin de répondre à cette problématique, une approche alternative serait d'utiliser des dérivés conformationnellement restreints de l'IAPP. En empêchant, ou en favorisant le peptide à adopter une certaine conformation, il serait alors possible d'obtenir de l'information sur les intermédiaires structuraux retrouvés au niveau de la phase de

latence de la cascade amyloïdogénique. Toutefois, il importe que l'incorporation de ces modifications chimiques ciblées ne conduise pas à une nouvelle voie amyloïdogénique.

## 2.2 Objectifs du projet

L'objectif global du projet était de déterminer le rôle de l'intermédiaire hélicoïdal dans le processus de formation de fibres amyloïdes. Ainsi, les objectifs spécifiques du projet étaient de ;

1. Développer des dérivés de l'IAPP ayant un ensemble conformationnel restreint,
2. Évaluer l'impact de ces modifications chimiques sur la formation de fibres amyloïdes en milieu homogène et en présence de biomolécules retrouvées à la membrane plasmique,
3. Évaluer la toxicité de ces dérivés sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques et comprendre le rôle de cet intermédiaire dans la dégénérescence cellulaire.



### CHAPITRE III

#### ARTICLE I : DELINEATING THE ROLE OF HELICAL INTERMEDIATES IN NATIVELY UNFOLDED POLYPEPTIDE AMYLOID ASSEMBLY AND CYTOTOXICITY

Les dépôts amyloïdes sont des caractéristiques communes de nombreuses maladies, telle que la maladie de l'Alzheimer. De nombreuses protéines amyloïdogéniques, incluant l'islet amyloid polypeptide (IAPP) associé au diabète de type II, sont nativement désordonnées et doivent subir des réarrangements conformationnels permettant la formation de structures localement ordonnées pour amorcer l'autoassemblage. De récentes études ont indiqué que la formation d'intermédiaires de conformation en hélice- $\alpha$  accélère l'amyloïdogénèse, suggérant que ces espèces pourraient être « on-pathway » dans la formation de fibres amyloïdes. En identifiant un dérivé de l'IAPP affichant un ensemble conformationnel restreint qui s'autoassemble avec l'IAPP, nous avons observé que les structures hélicoïdales sont « off-pathway » en milieu homogène ainsi qu'en présence de bicouches lipidiques et de glycosaminoglycanes. De plus, la prévention d'un repliement hélicoïdal accroît la perturbation membranaire et la cytotoxicité de l'IAPP, indiquant que la stabilisation du motif hélicoïdal serait une stratégie prometteuse afin de prévenir la dégénérescence cellulaire associée avec l'amyloïdogénèse.

Article accepté dans Angewandte Chemie.

Delineating the Role of Helical Intermediates in Natively Unfolded Polypeptide  
Amyloid Assembly and Cytotoxicity\*\*

Carole Anne De Carufel<sup>1,2</sup>, Noé Quittot<sup>1,2</sup>, Phuong Trang Nguyen<sup>1,2</sup>, and Steve  
Bourgault<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Pharmaqam, University of Quebec in Montreal.

<sup>2</sup>Quebec Network for Research on Protein Function, Structure and Engineering  
(PROTEO)

Carole Anne De Carufel est la principale personne impliquée dans le projet. Elle a synthétisé et purifié les peptides impliqués dans la recherche. Elle a optimisé et effectué les expériences retrouvées dans l'article. Elle a participé à la recherche bibliographique ainsi qu'à la rédaction de la première version de l'article. Noé Quittot a grandement participé au projet. Il a répliqué plusieurs expériences et a aidé à l'optimisation de certaines d'entre elles. Phuong Trang Nguyen a participé à la synthèse et la purification du peptide-dérivé ainsi que plusieurs expériences retrouvées dans l'article. Steve Bourgault, le directeur de recherche, a eu l'idée du projet et a grandement participé à la recherche bibliographique et à la rédaction de l'article.



## ABSTRACT

Amyloid deposition is a hallmark of many diseases, such as the Alzheimer's disease. Numerous amyloidogenic proteins, including the islet amyloid polypeptide (IAPP) associated with type II diabetes, are natively unfolded and need to undergo conformational rearrangements allowing the formation of locally ordered structure(s) to initiate self-assembly. Recent studies have indicated that the formation of  $\alpha$ -helical intermediates accelerates fibrillization, suggesting that these species are on-pathway to amyloid assembly. By identifying an IAPP derivative with a restricted conformational ensemble that co-assembles with IAPP, we observed that helical species were off-pathway in homogenous environment and in presence of lipid bilayers or glycosaminoglycans. Moreover, preventing helical folding potentiated membrane perturbation and IAPP cytotoxicity, indicating that stabilization of helical motif(s) is a promising strategy to prevent cell degeneration associated with amyloidogenesis.

## TOC – Text:

**Amyloid formation** resulting from the self-assembly of natively unfolded polypeptide was studied by means of a conformationally restricted derivative that co-assemble with the native peptide. Preventing islet amyloid polypeptide helical folding enhanced its amyloidogenicity in presence of anionic biosurfaces and potentiated its toxicity towards pancreatic  $\beta$ -cells.

## Keywords:

amyloid, islet amyloid polypeptide,  $\alpha$ -helix, membrane models, glycosaminoglycans

Protein aggregation and amyloid deposition are associated with several diseases, including Alzheimer's disease and type II diabetes (Chiti et Dobson, 2006). More than 30 proteins have been identified as precursors of amyloids whose deposition is linked to cellular degeneration (Chiti et Dobson, 2006). While fibrils assembled from these proteins display common structural characteristics, amyloid precursors share no sequence or native state structure homologies (Chiti et Dobson, 2006). Amyloidogenic polypeptides can be assigned to two different structural classes; those that are natively unfolded and those that show a well-defined structure in their soluble state. Natively folded proteins need to partially unfold, or misfold, in order to form amyloids. In contrast, intrinsically disordered polypeptides (IDPs), such as the amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) and the islet amyloid polypeptide (IAPP), need to undergo conformational rearrangements allowing the formation of locally ordered structure(s) to self-assemble (Abedini et Raleigh, 2009). Cell and animal models have shown that intermediate species of the amyloidogenic cascade are more deleterious than fibrils (Kayed et al., 2003; Demuro et al., 2005; Meier et al., 2006; Bourgault et al., 2011). Although the molecular structure(s) of the proteotoxic species and the mechanisms of cytotoxicity are still unknown, these studies reinforce the importance of elucidating the initial conformational rearrangements that trigger amyloidogenesis.

IAPP is the main component of amyloid deposits observed in the pancreatic islets of type II diabetes patients and the amyloidogenic process is known to exacerbate pancreatic  $\beta$ -cell loss (Westermarck et al., 2011). The current view implies that IAPP cytotoxicity is mediated by oligomers and/or prefibrillar aggregates that can be either on- or off-pathway to amyloid formation (Abedini et Raleigh, 2009; Cao et al., 2013). This 37-residue hormone exhibits a disordered conformation, although it diverges from an absolute random coil by the presence of local and transient helical structures (Williamson et Miranker, 2007; Soong et al., 2009; Brender et al., 2012). In membrane environment, IAPP adopts a  $\alpha$ -helix that spans between A5 to N22 (Apostolidou et al., 2008; Nanga et al., 2009; Patil et al., 2009; Williamson et al., 2009; Nanga et al., 2011).

Recent findings have suggested that IAPP helical conformation represents key structural motif for the intermolecular recognition that initiates assembly and that  $\alpha$ -helical oligomers are relevant to toxic functions (Knight et al., 2006; Saraogi et al., 2010; Nath et al., 2011). Helical intermediate species could be important for the aggregation and toxicity of amyloidogenic IDPs, including A $\beta$  and  $\alpha$ -synuclein (Kirkittadze et al., 2001; Zhu et al., 2003; Abedini et Raleigh, 2009), although this hypothesis is still the matter of active debates.

Two models have been proposed for the conformational rearrangements that initiate IAPP oligomerization and drive amyloid formation. On the one hand, it was proposed that IAPP early oligomerization steps include the formation of  $\beta$ -strand rich dimers and that amyloids are assembled from ordered  $\beta$ -hairpins (Dupuis et al., 2009; Dupuis et al., 2011; Buchanan et al., 2013). On the other hand, the helical intermediates model proposes that association is thermodynamically linked to helix formation within the 5-22 segment. Helical oligomers would generate a high local concentration of the C-terminal amyloidogenic segment, favoring the formation of intermolecular  $\beta$ -sheets (Abedini et Raleigh, 2009). Detecting transient intermediate species of the amyloidogenic cascade by spectroscopic approaches is challenging, particularly in the context of the interactions with biological factors that are relevant to *in vivo* deposition. Assessing if these intermediates are either on- or off-pathway to fibril formation is even more demanding. An alternative strategy to probe transitions that initiate IDP self-assembly could consist of introducing discrete chemical modifications to restrict the conformational ensemble. Destabilizing on-pathway species should delay, or inhibit, amyloid formation whereas disrupting off-pathway species should either not affect fibrillization or accelerate it by closing a competing pathway. However, it is crucial that this modification does not lead to an alternative pathway.

In this study, we investigated the role of helical intermediates in amyloid formation and induced-cytotoxicity by restricting the conformational ensemble of IAPP. Analogs in

which two adjacent residues of IAPP putative helical region are successively substituted by their corresponding D-enantiomers were designed (Supporting Information). Incorporation of two D-residues within a  $\alpha$ -helix is known to result in a local disturbance without modifying significantly the physicochemical properties (Wieprecht et al., 1996; Tchoumi Neree et al., 2014). Among all derivatives evaluated, [f<sup>15</sup>, l<sup>16</sup>]hIAPP, or D-hIAPP, was unique for its random coil structure that persists in presence of the helical-inducing solvent trifluorethnaol (TFE) and for its kinetics of fibrillization. By circular dichroism (CD) spectroscopy, hIAPP and D-hIAPP exhibited spectra with a single minimum at 203 nm, indicative of a random coil structure (Figure 1a). Incorporation of D-residues at positions 15 and 16 prevented TFE-induced helical folding of IAPP (Figure 1).

The effect of this modification on amyloid assembly was evaluated using thioflavin T (ThT) fluorescence, atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM). ThT is a dye that fluoresces upon its binding to protein aggregates rich in cross- $\beta$ -sheets. Under the conditions of fibrillization, hIAPP displayed a  $T_{50}$  of  $9.86 \pm 1.41$  h whereas D-hIAPP exhibited a similar kinetics with a  $T_{50}$  of  $9.33 \pm 0.73$  h (Figure 1c). At all concentrations evaluated, D-hIAPP and hIAPP had equivalent kinetics of self-assembly (Figure 1d). By AFM and TEM, D-hIAPP fibrils were significantly longer than the ones from hIAPP while both amyloid preparations had comparable average height (Figure 1e, 1f; Supporting Information for characterization). Although fibrils formed by D-hIAPP and hIAPP were different at the macroscopic level, CD spectroscopy revealed a comparable secondary structure within these assemblies (Supporting Information). Moreover, both sonicated amyloids were competent to seed fibril growth with an equivalent potency (Supporting Information), suggestive of structural similarities. As revealed by solid state NMR, IAPP fibrils consist of two columns of symmetry related monomers and each monomer contains two  $\beta$ -strands connected by a bend-loop (Luca et al., 2007). In this model, residues F15 and L16 are in the  $\beta$ -strand that is located on the outer surface of the column. Inversion

of the chirality of these two residues most likely affects side-chain orientations within this strand and can modulate lateral association of protofilaments and/or monomer addition.

The equivalent kinetics of nucleation ( $T_{50}$  and lag phase) suggests that both peptides could undergo similar conformational rearrangements to initiate self-assembly. To evaluate this hypothesis, equimolar of hIAPP and its D,D-counterpart were mixed together and the kinetics of fibrillization was measured. Strikingly, the kinetics of amyloid formation of 6.25  $\mu\text{M}$  hIAPP mixed with 6.25  $\mu\text{M}$  D-hIAPP were equivalent to a homogenous 12.5  $\mu\text{M}$  solution of hIAPP or D-hIAPP alone, with a  $T_{50}$  of  $10.02 \pm 0.96$  h (Figure 2a). Similar results were obtained for total concentrations from 6.25 to 50  $\mu\text{M}$ . Fibrils obtained from a mixture of hIAPP/D-hIAPP were morphologically equivalent to D-hIAPP assemblies (Figure 2b). Incorporation of D-residues at positions 15 and 16 in the non-amyloidogenic rodent IAPP (rIAPP) led to a sharp decrease of its helical folding whereas no effect on its amyloidogenicity was observed (Supporting Information). Taken together, fibril formation kinetics and co-assembly experiments suggest that helical species are off-pathway to amyloid assembly in an aqueous solution.

Amyloid formation *in vivo* takes place in a complex environment and amyloids extracted from patients are associated with components of the extracellular matrix (ECM) and the plasma membrane. Studies have shown that sulfated glycosaminoglycans (GAGs) and lipid membranes hasten fibrillogenesis. Upon binding to GAGs or anionic membranes, IAPP adopts a helical conformation before converting into  $\beta$ -sheets structure (Abedini et Raleigh, 2009; Nanga et al., 2011; Brender et al., 2012; De Carufel et al., 2013). As amyloid assembly is faster under conditions that facilitate the formation of nucleating species, these helical intermediates were hypothesized to be on-pathway (Knight et al., 2006; Abedini et Raleigh, 2009). Thus, we evaluated the effect of hindering the helical folding of IAPP on the

fibrilization kinetics in presence of membrane models and GAGs. When hIAPP was incubated in presence of 100-nm LUVs composed of phosphocholine/phosphoglycerol (DOPC/DOPG; 7/3), fibrillization was drastically enhanced (Figure 3a). The accelerating effects of LUVs was more pronounced for D-hIAPP compared to hIAPP, with lag phase of  $9.8 \pm 4.3$  min and  $71.2 \pm 7.4$  min, respectively. Binding of hIAPP to anionic LUVs led to the formation of helical structures (Figure 3b). In contrast, D-hIAPP remained mainly random coil, consistent with the conformational restriction imposed by the D,D-substitution. After 4 h incubation with LUVs, both peptides were converted into  $\beta$ -sheet-rich structure. Conformational conversion, measured with the  $\theta_{220}/\theta_{208}$  ratio, correlated closely to the kinetics of amyloid formation measured by ThT-fluorescence (Figure 3c). Similarly, preventing helical folding potentiated the amyloidogenic effect of heparin, employed as a model of the sulfated domains of heparan sulfate (Supporting Information). These data indicate that upon binding to anionic biosurfaces, IAPP undergoes a random coil-to- $\alpha$ -helix conformational conversion and that inhibition of helical formation dramatically hastens self-assembly, suggesting that these species are off-pathway.

Protein deposition in pancreatic islets correlates with  $\beta$ -cell degeneration and several inter-connected mechanisms have been proposed to explain IAPP toxicity (Cao et al., 2013). Plasma membrane disruption by pre-fibrillar species, which can trigger various pathways of cell death is one of the most studied mechanisms (Brender et al., 2012). Reports have suggested that the loss of membrane integrity results from pore formation (Anguiano et al., 2002; Last et al., 2011) and that helical intermediates could be the active membrane species (Magzoub et Miranker, 2012). In this view, several helical mimetics were recently developed to target the membrane-bound  $\alpha$ -helix and to prevent their oligomerization (Hebda et al., 2009; Saraogi et al., 2010; Kumar et al., 2015). These compounds were shown to reduce IAPP amyloid formation in presence of membranes and to decrease toxicity. Nonetheless, whether or not these helical species are toxic themselves or are off- or on-pathway to cytotoxicity remains

unknown. The helically-frustrated D-hIAPP analog appears as a unique tool to address this question. We initially examined the ability of hIAPP and D-hIAPP to induce leakage of DOPC/DOPG LUVs. The fluorescent dye calcein was encapsulated at high concentration within the vesicles, leading to its self-quenching and upon membrane disruption, the dye is released and fluorescence is restored. Leakage was measured after 10 min and 5 h incubation with lipid/peptide ratios between 6:1 and 80:1 (Cao et al., 2013). Peptides hIAPP and D-hIAPP induced a similar concentration-dependant vesicle leakage (Figure 4a). The non-amyloidogenic rIAPP and D-rIAPP also induced membrane leakage, although their effects were less pronounced (Supporting Information).

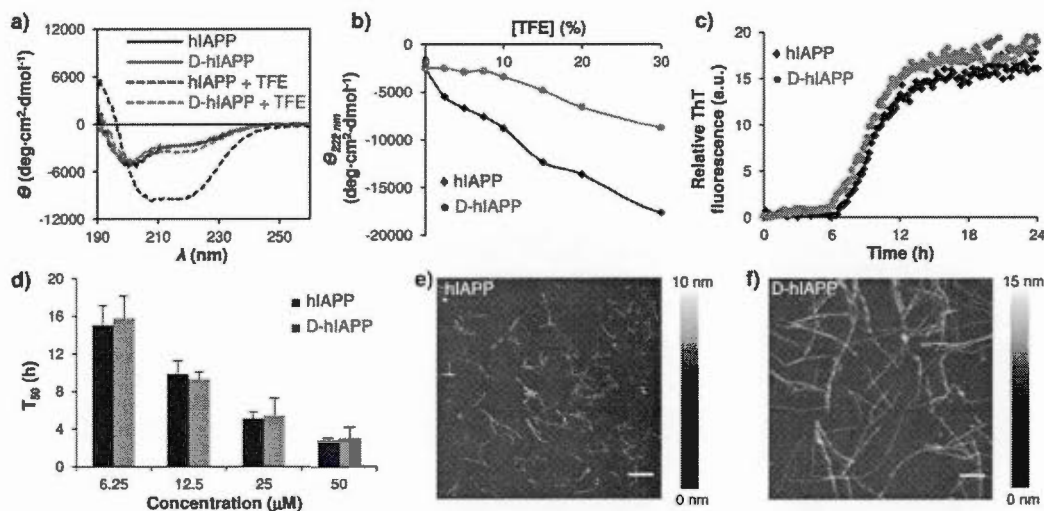
While monitoring the time course of vesicle disruption, a multiphase process was observed for hIAPP; a plateau after 60 min followed by a second phase leading to maximum leakage (Figure 4b). The second phase correlated closely with formation of ThT-positive species and the kinetics of  $\alpha$ -helix-to- $\beta$ -sheet structural conversion. For the non-amyloidogenic rodent IAPPs, which do not form ThT-positive species in presence of LUVs, a single phase was detected (Supporting Information). This suggests that the first phase of membrane disruption is related to the binding of non-fibrillar species to lipid vesicles and the second phase is mediated by fibril growth (Brender et al., 2011; Cao et al., 2013). This multistep process was not discernable for D-hIAPP, because fibrillization occurs so fast that it cannot be easily discernible from prefibrillar species binding. Vesicle leakage experiments indicated that IAPP helical folding postpones membrane disruption associated with fibril growth.

Next, we evaluated the role of transient helical conformations in toxicity using INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells. Treatment with hIAPP induced a concentration-dependent decrease of cellular viability (Figure 5a). Incorporation of a destabilizing motif within hIAPP putative  $\alpha$ -helix increased its cytotoxicity. D-hIAPP was not only more cytotoxic but its deleterious effects on viability occurred more rapidly (Figure 5b). After 12 h, hIAPP

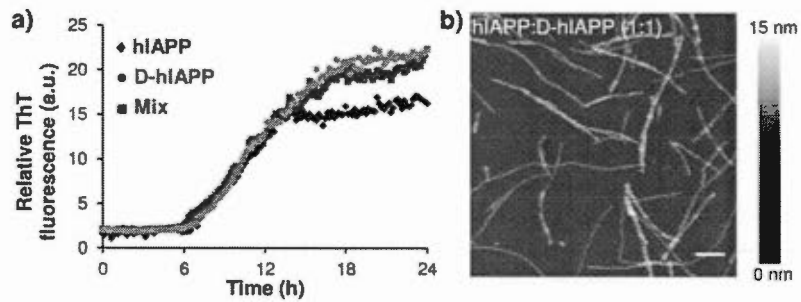
(50  $\mu$ M) reduced cellular viability to  $63.8 \pm 9.0$  % while a viability of  $12.4 \pm 2.1$  % was observed for its D,D-counterpart. To confirm this time-dependent effect and to assess if both peptides used similar mechanisms to induce cell death, caspases activation and intracellular calcium level were measured. A significant increase of apoptosis signal was detected after only 4 h treatment with D-hIAPP whereas a treatment time of 12 h was needed to activate caspases with hIAPP (Figure 5c). Similar effect was observed for cytosolic calcium level, a signal of cellular dysfunction associated with several death mechanisms (Figure 5d). The fact that hindering IAPP helical folding potentiated its toxicity suggests that the formation of  $\alpha$ -helix pre-fibrillar species is not required for cell death and it could be even protective.

By identifying a derivative with a restricted conformational ensemble that co-assembles with IAPP, we provided unique insights into the mechanisms of IDP amyloidogenesis. Our results suggest that helical conformations are off-pathway to amyloid formation and delineate the roles of  $\alpha$ -helix species in membrane perturbation and toxicity. This study emphasizes that the stabilization of a transient helical motif within an amyloidogenic IDP constitutes a promising strategy to inhibit assembly and to prevent cell degeneration.

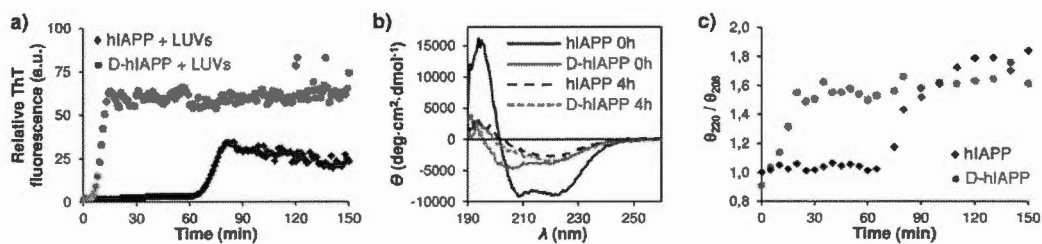




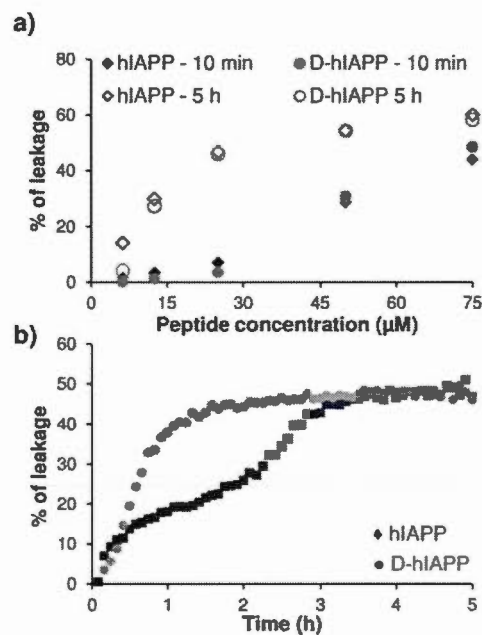
**Figure 1.** Effect of destabilizing IAPP putative helical domain on amyloid formation. a) CD spectra of 25  $\mu\text{M}$  hIAPP and 25  $\mu\text{M}$  D-hIAPP in Tris-HCl pH 7.4 (solid lines) and in 10% TFE (dashed lines). b) TFE titration into hIAPP and D-hIAPP measured by the ellipticity at 222 nm. c) Amyloid formation monitored by ThT fluorescence of 12.5  $\mu\text{M}$  peptides. d) Rates of amyloid formation at different concentrations. e, f) AFM images of 50  $\mu\text{M}$  hIAPP and D-hIAPP after 24 h incubation. Scale bar: 500 nm.



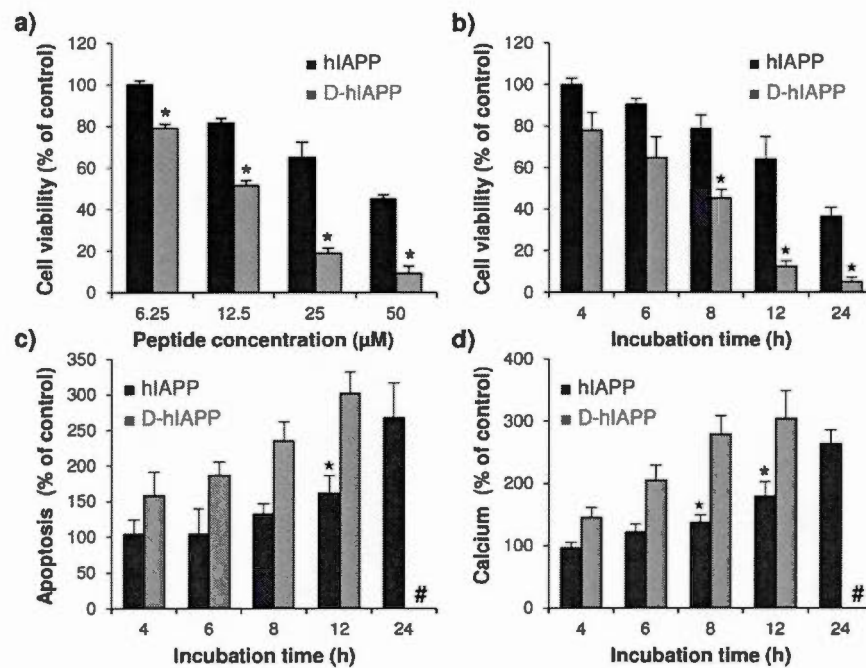
**Figure 2.** hIAPP and D-hIAPP co-assemble into amyloid fibrils. a) Kinetics of amyloid formation of 12.5  $\mu\text{M}$  hIAPP, D-hIAPP and of a aggregation mixture containing 6.25  $\mu\text{M}$  of hIAPP and 6.25  $\mu\text{M}$  of D-hIAPP (mix). b) AFM images of 25  $\mu\text{M}$  hIAPP mixed with a equimolar concentration of D-hIAPP after 24 h incubation. Scale bar: 500 nm.



**Figure 3.** Destabilizing IAPP helical segment potentiates the accelerating effect of model membranes on amyloid formation. a) Kinetics of amyloid formation of 12.5  $\mu$ M hIAPP and D-hIAPP in presence of 500  $\mu$ M DOPC/DOPG (7:3) LUVs. b) CD spectra of hIAPP and D-hIAPP in presence of LUVs before (solid lines) and after 4 h incubation. c) Conformational conversion measured by the ratio of ellipticity at 220/208.



**Figure 4.** Role of helical intermediates in IAPP-induced membrane leakage. a) Percentage of membrane leakage of DOPC/DOPG (7:3) LUVs by hIAPP and D-hIAPP after 10 min and 5 h incubation (open). b) Kinetics of membrane leakage of DOPC/DOPG (7:3) LUVs by 25  $\mu\text{M}$  hIAPP and D-hIAPP.



**Figure 5.** Destabilizing IAPP helical segment potentiates cytotoxicity on pancreatic  $\beta$ -cells. a) Viability of INS-1 cells treated with hIAPP and D-hIAPP for 24 h. b) Kinetics of reduction of INS-1 cell viability by 50  $\mu$ M of hIAPP and D-hIAPP. c) Caspases 3/7 activation by 50  $\mu$ M hIAPP and D-hIAPP measured over treatment time. d) Evaluation of intracellular calcium level after treatment with 50  $\mu$ M hIAPP and D-hIAPP. Results are expressed as percentage of the vehicle treated cells  $\pm$  SEM. \*Statistically significant difference between hIAPP and D-hIAPP ( $P < 0.05$ ). # Data could not be obtained because of high extent of cell death.

## **Supporting Information**

### **Delineating the Role of Helical Intermediates in Natively Unfolded Polypeptide Amyloid Self-Assembly and Cytotoxicity\*\***

Carole Anne De Carufel, Noé Quittot, Phuong Trang Nguyen and Steve Bourgault\*

## Supporting Information

Materials and Methods.....	60
Figure S1.....	68
Figure S2.....	69
Figure S3.....	70
Figure S4.....	71
Figure S5.....	72
Figure S6.....	73
Figure S7.....	74
Figure S8.....	75
Figure S9.....	76
Figure S10.....	77
Figure S11.....	78
Figure S12.....	79
Figure S13.....	80
References.....	81

## Materials and Methods

### Materials

Fmoc-protected amino acids, Rink-amide AM and (2-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate) (HCTU) were obtained from Matrix Innovation (Québec, Canada). 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DOPG) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, average molecular weight of 17 kDa ( $\pm$  2 kDa), was obtained from Sigma-Aldrich. The Caspase-Glow kit was from Promega (Madison, USA). The calcium indicator Fluo-3 acetoxymethyl ester (Fluo-3AM) was purchased from Life Technologies (Carlsbad, USA). Laboratory consumables (filters, microplates, *etc*) were obtained from Fisher Scientific (Nepean, Canada). All other chemical and reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

### Solid phase peptide synthesis

IAPP and its analogs were synthesized by solid phase using a TRIBUTE-IR peptide synthesizer (Protein Technology) based on Fmoc chemistry. Briefly, all amino acids (5 equiv.) were coupled using an *in situ* activation with HCTU and diisopropylethylamine (DIEA) in dimethylformamide (DMF). Rink-amide AM-functionalized polystyrene resin was used as the solid support. Fmoc-protecting group was removed with 20% piperidine in DMF. For human-IAPP and its analogs, three oxazolidine pseudoproline dipeptides were incorporated into the peptide sequence in order to facilitate the synthesis. Fmoc-Ser-Ser(ψMe,Mepro)-OH was incorporated at positions Ser-19 and Ser-20, Fmoc-Leu-Ser(ψMe,Mepro)-OH was inserted at positions Leu-27 and Ser-28



whereas Fmoc-Ala-Thr(psiMe,Mepro)-OH was incorporated at positions of Ala-8 and Thr-9(Abedini et Raleigh, 2005). Cleavage from the resin was achieved with a mixture of TFA/ethanedithiol/phenol/water (92/2.5 /3 /2.5) for 3 h. After filtration of the resin and subsequent TFA evaporation, the peptide was precipitated with diethylether and resolubilized in 20% acetic acid (v/v) before being lyophilized.

### **Peptide purification, cyclisation and characterization**

Crude peptides were dissolved in 35% acetic acid and purified by preparative reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 300 Å) column (250 x 21.2 mm<sup>2</sup>) and a linear gradient of acetonitrile (ACN) in H<sub>2</sub>O/TFA (0.06% v/v). Collected fractions were analyzed by analytical RP-HPLC, using a C<sub>18</sub> (3.6  $\mu$ m, 300 Å) column (250 x 4.6 mm<sup>2</sup>) and by time-of-flight mass spectrometry (LC/MS-TOF). Fractions corresponding to the desired product, as revealed by MS-TOF analysis, were pooled and lyophilized. Disulfide bond formation between Cys-2 and Cys-7 was achieved on lyophilized pre-purified peptide by dimethyl sulfoxide (DMSO) oxidation during 24 hours, according to the method developed by Abedini et al.(Abedini et al., 2006). After incubation, 50% acetic acid was added to the peptide mixture to a final ratio of 9:1 (v/v) and IAPP was purified by RP-HPLC as described above. Fractions corresponding to the desired product, as revealed by MS-TOF analysis, and with purity higher than 95%, confirmed by analytical RP-HPLC, were finally pooled and lyophilized.

### **IAPP sample preparation**

Aliquots of monomerized IAPP were prepared by dissolving the lyophilized and purified peptide in 100% hexafluoro-2-propanol (HFIP) to a concentration of 1 mg/mL.

The solution was sonicated for 30 min and filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  hydrophilic PVDF filter before being lyophilized. The resulting peptide powder was solubilized for the second time in HFIP, sonicated for 30 min and the solution was aliquoted and lyophilized. Monomerized IAPP samples were kept dried at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used, but not for longer than 4 weeks.

### **Large unilamellar vesicles preparation**

Large unilamellar vesicles (LUVs) were formed of DOPC/DOPG (7:3 ; molar ratio). Lipids were solubilized in 100% chloroform in a glass tube and evaporated with a nitrogen gas stream. The lipid film was then rehydrated in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 for at least 30 minutes. The solution was freeze-thawed 5 times before being extruded through a 0.1  $\mu\text{m}$  nucleopore membrane for 15 cycles. For membrane leakage assays, the lipid film was rehydrated in a 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer containing 70 mM calcein. The solubility of calcein (fluorescein complex) was increased by dropwise addition of 5M NaOH until the solution turn transparent, as previously described. Nonencapsulated calcein molecules were removed by a size-exclusion chromatography using Sephadex G-25 fine and an elution buffer of 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4. Lipid concentration was determined by the inorganic phosphate detection colorimetric assay (Carles, 1956). The size and homogeneity of the LUVs were confirmed by dynamic light scattering (DLS).

### **Kinetics of amyloid formation measured by thioflavin T fluorescence**

IAPP solutions were prepared by dissolving the lyophilized and monomerized IAPP at  $2\times$  concentrations (ranging from 100 to 12.5  $\mu\text{M}$ ) in 20 mM Tris, pH 7.4, containing 40  $\mu\text{M}$  thioflavin T (ThT) immediately before final dilution and measurement. Heparin

solution was prepared as a 4 mg/mL stock solution in the corresponding buffer and diluted to reach the desired final concentrations in the IAPP aggregation mixture. LUVs were prepared as described above and diluted to a final concentration of 500  $\mu$ M (expressed in monomer units) in the corresponding buffer. Kinetics of amyloid formation were performed at 25°C without stirring in sealed black-wall, clear-bottom 96 well non-binding surface treated plates (Corning) with a total volume of 100  $\mu$ L per well. ThT fluorescence was measured either every 10 min over the course of 24 h (homogenous solution) or every minute during 5 hours (LUVs/heparin) using an Infinite M1000 TECAN Pro fluorescence plate reader. Fluorescence was measured from the bottom of the well using an excitation wavelength of 440 nm and an emission wavelength of 485 nm. Each representative curve represents the average of a single experiment performed in triplicate. Data of time-dependence of ThT fluorescence were fitted to a sigmoidal growth model where the  $T_{50}$  is the time required to reach half of the fluorescence intensity,  $k$  is the apparent first-order constant and  $Y_{\max}$  and  $Y_0$  are, respectively, the maximum and initial fluorescence values:

$$Y = Y_0 + (Y_{\max} - Y_0)/(1 + \exp(-(T - T_{50})/k))$$

The lag time, the time before detectable amyloid formation occurs, as predicted by means of the nucleation dependent polymerization model, was described as  $T_{50} - 2/k$ . Data of at least three individual experiments performed with different lots of peptides were averaged and were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M..

### **Membrane leakage assays**

Lyophilized and monomerized IAPP samples were solubilized in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 at 100  $\mu$ M prior to dilution in calcein-LUVs solution at the desired final concentrations (6.25 to 75  $\mu$ M). LUVs were used at a final concentration of 500  $\mu$ M. Fluorescence was monitored in sealed black-wall, clear-bottom 96 well non-

binding surface plates (Corning) with a total volume of 100  $\mu$ L per well. Measurements were performed every 5 minutes over 24 hours using an excitation wavelength of 495 nm and an emission wavelength of 517 nm. The control used to determine 100% leakage ( $F_{\max}$ ) was calcein-LUVs with 0.2% Triton X-100. Dye leakage was reported using the following equation (Brender et al., 2013):

$$\% \text{dye leakage} = (F - F_{\text{baseline}}) / (F_{\max} - F_{\text{baseline}})$$

where  $F_{\text{baseline}}$  is the fluorescence of the LUVs in absence of peptide. Data of at least three individual experiments performed with different lot of peptides were averaged and were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M..

### **Circular dichroism spectroscopy**

IAPP was dissolved in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 to reach the final desired concentrations, in presence or absence of heparin or LUVs. The sample was immediately incorporated into a 2 mm path length quartz cell before far-UV CD spectra were recorded from 190 to 260 nm using a J-815, Jasco circular dichroism spectrometer at 25°C. The wavelength step was set at 0.5 nm with an average time of 10 s per scan at each wavelength step. Each collected spectrum was background subtracted with the corresponding IAPP-free sample (buffer alone, heparin or LUVs). Each spectrum represents the average of at least two independent experiments. Raw data were converted to mean residue ellipticity (MRE):

$$\text{MRE} = \frac{\text{Mean residue weight (g. mol}^{-1}\text{)} \times \text{CD signal (deg)}}{10 \times \text{pathlength (cm)} \times \text{protein concentration (g. ml}^{-1}\text{)}}$$

### **Atomic force microscopy**

Lyophilized and monomerized IAPP was solubilized in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at a final concentration of 50  $\mu$ M. Solution was incubated for 24 hours at 25°C without agitation before being diluted to 5  $\mu$ M in 1% acetic acid and immediately applied to a freshly cleaved mica, as previously reported (Luca et al., 2007). The mica was washed twice with deionized water and air-dried for 24 hours after blotting. Images were acquired on a Veeco/Bruker Multimode AFM using tapping mode with a silicon tip (2-12 nm tip radius, 0.4 N/m force constant) on a nitride lever. Images were taken at 0.2 Hz and 1024 scan/minute. For quantification analysis, the width and length of at least 50 individual fibrils per experiments were determined and plotted as a frequency distribution using the Prism 6.0 software. Data (height and length) of at least three individual experiments performed with different lots of peptides were averaged and were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.

### **Transmission electron microscopy**

Lyophilized and monomerized IAPP was solubilized in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, at a final concentration of 50  $\mu$ M. The solution was incubated for 24 hours at 25°C without agitation before being diluted to 5  $\mu$ M in deionized water. Solutions were applied to glow-discharged carbon films on 300 mesh copper grids. After adsorption for 1 min and blotting, samples were negatively stained with 1.5% uranyl formate for 1 min and air-dried for 15 minutes. Images were recorded using a FEI Tecnai 12 BioTwin microscope operating at 120 kV and equipped with a AMT XR80C CCD camera system.

### **Membrane flotation assay**

Binding of hIAPP and D-hIAPP to LUVs was evaluated using a membrane flotation assay (Knight et Miranker, 2004; Baden et al., 2008). LUVs composed of either 100% DOPC or DOPC/DOPG (7:3) were prepared as above-described. LUVs were mixed with IAPP to reach a final concentration of 3.75 mM and 50  $\mu$ M, respectively, in 10 mM phosphate buffer pH 7.4, and incubated at room temperature for 10 minutes. The solution was mixed with 80% sucrose solution to reach a final sucrose concentration of 25% for a total volume of 125  $\mu$ L. The fraction was overlaid with 25  $\mu$ L of 10% sucrose and then with 50  $\mu$ L 20 mM Tris-HCl pH 7.4. Samples were centrifuged for 1 hour at 50,000g using a L8-70M ultracentrifuge and a rotor Type 42.2 Ti (Beckman Instruments Inc.). Fractions of 40  $\mu$ L were collected at the top and the bottom of each tube before being analyzed by SDS-PAGE (Tris-Tricine gel system). Gels were fixed for 1 hour in 3.7% formaldehyde before silver staining.

### **Cell toxicity assays**

Rat INS-1E cells were seeded in black wall clear bottom 96-well plates (Tissue culture treated) at a density of 30,000 cells/well (100  $\mu$ L/well) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol. After 48 h incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, cells were treated with 50  $\mu$ l of freshly diluted peptides at a 3 $\times$  concentration (20 mM Tris, pH 7.4). Cells were then incubated for 2 to 24 h. After the time of IAPP treatment, cell viability was measured by means of the resazurin reduction assay (50  $\mu$ M) and the activation of caspase 3/7 was measured by using the Caspase-Glow kit. Cell viability (in %) was calculated from the ratio of the fluorescence of the treated sample to the control cells (non-treated). Data (in %) of at least four individual experiments performed in triplicate with different lots of peptides

were averaged and were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.. Evaluation of the results was made using the Student's *t*-test and statistical difference (between hIAPP and D-hIAPP) was established at  $P < 0.05$ . Statistical analysis was performed using Prism 6.0 software.

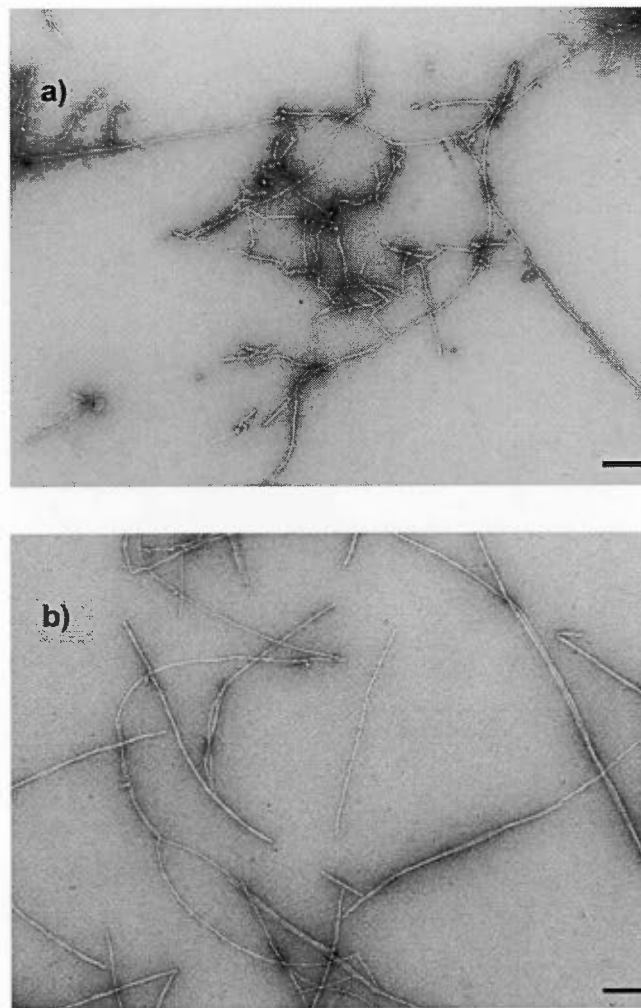
### **Evaluation of intracellular calcium level**

Intracellular calcium level assays were performed by seeding the INS-1E cells as described above. After IAPP treatment, cells were washed once with calcium buffer (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), HEPES and 72 g/L probenecid in NaOH 0.5 N (200:1:2 v/v)) before incubating the cells with the probe solution (calcium buffer/fluorimic acid/ 5  $\mu$ M Fluo-3AM (1000:1:1 v/v) for 30 minutes at 37°C (Vaudry et al., 2009; Evangelisti et al., 2012). Cells were washed once again with the calcium buffer and the fluorescence was measured at an excitation/emission of 480/525 nm. Calcium level (in %) was calculated from the ratio of the fluorescence of the treated sample to the control cells (non-treated). Data (in %) of at least four individual experiments performed in triplicate with different lots of peptides were averaged and were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.. Evaluation of the results was made using the Student's *t*-test and statistical difference (between hIAPP and D-hIAPP) was established at  $P < 0.05$ . Statistical analysis was performed using Prism 6.0 software.

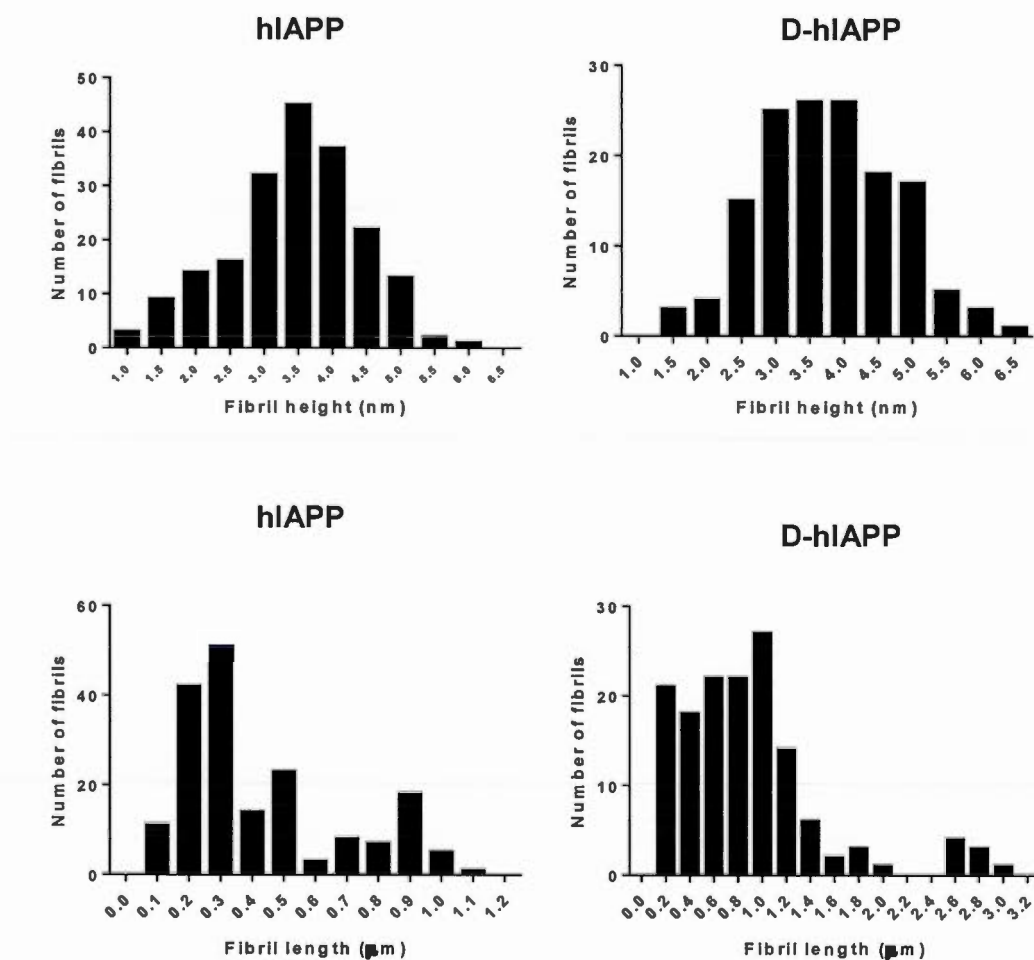
	Helical domain
hIAPP	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY
D-hIAPP	KCNTATCATQRLANfLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY
rIAPP	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY
D-rIAPP	KCNTATCATQRLANfLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY

**Figure S1.** Sequence of human IAPP (hIAPP) and its derivatives. Residues that differ from hIAPP are represented in red whereas D-enantiomeric residues are indicated in blue lower case. All peptides have a disulfide bond between C2 and C7 and a C- $\alpha$ -amidated C-terminus.

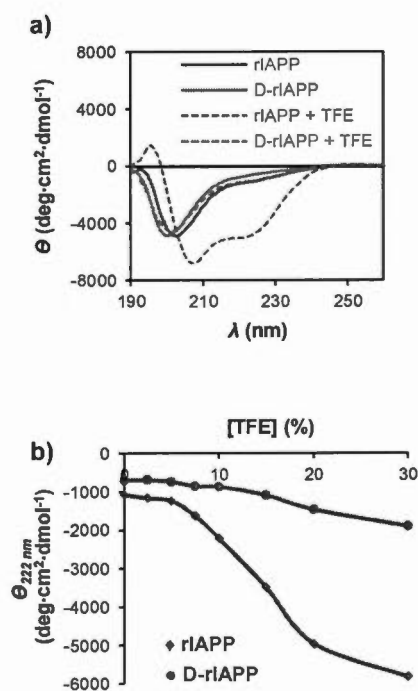




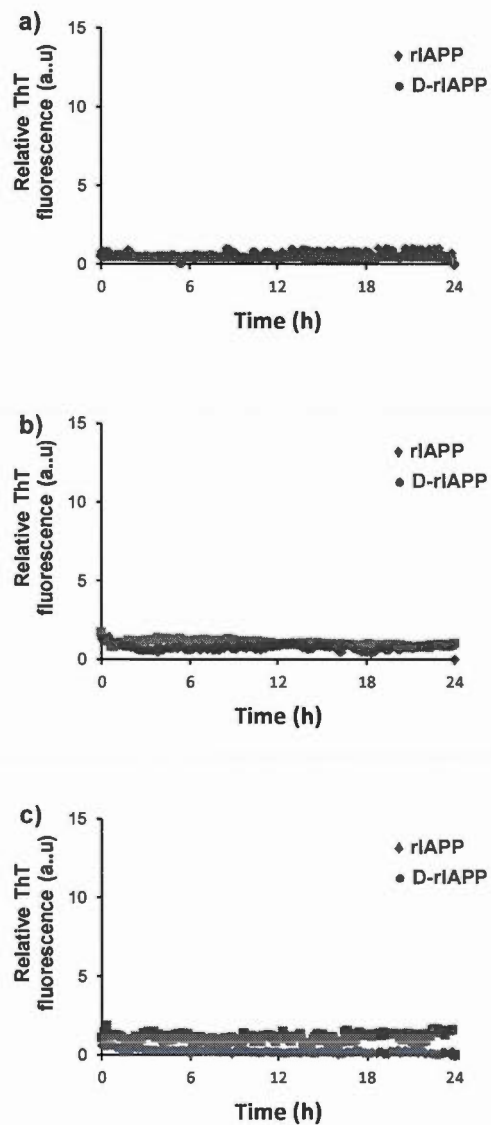
**Figure S2.** Representative transmission electron microscopy images of negatively stained hIAPP (a) and D-hIAPP (b) amyloid fibrils. Amyloid fibrils were formed after 24 h. incubation at 25°C under quiescent condition at a concentration of 50  $\mu$ M. Scale bar: 200 nm.



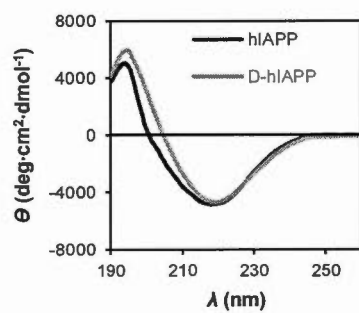
**Figure S3:** Distribution of height and length of hIAPP and D-hIAPP amyloid fibrils extracted from AFM images. Amyloid fibrils were assembled by incubating the peptide for 24 h. at 25°C under quiescent condition at a concentration of 50 μM. hIAPP amyloid fibrils have an average height of  $3.43 \pm 0.08$  nm and an average of length of  $0.42 \pm 0.19$  μm. D-hIAPP amyloid fibrils have an average height of  $3.75 \pm 0.22$  nm and an average of length of  $0.88 \pm 0.14$  μm.



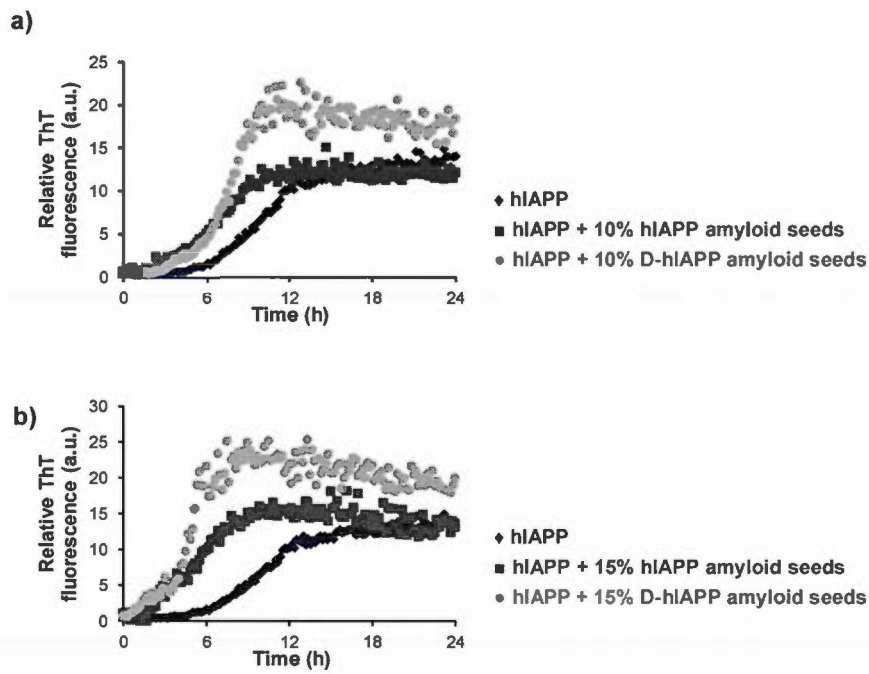
**Figure S4.** Incorporation of D-enantiomeric residues at positions 15 and 16 inhibits rIAPP helical folding induced by trifluoroethanol (TFE). a) CD spectra of 25  $\mu$ M rIAPP (purple) and 25  $\mu$ M D-rIAPP (orange) in Tris-HCl pH 7.4 (solid lines) and in presence of 15% TFE (dashed lines). b) TFE titration into rIAPP (purple) and D-rIAPP (orange) measured by the ellipticity at 222 nm in presence of 25  $\mu$ M peptide.



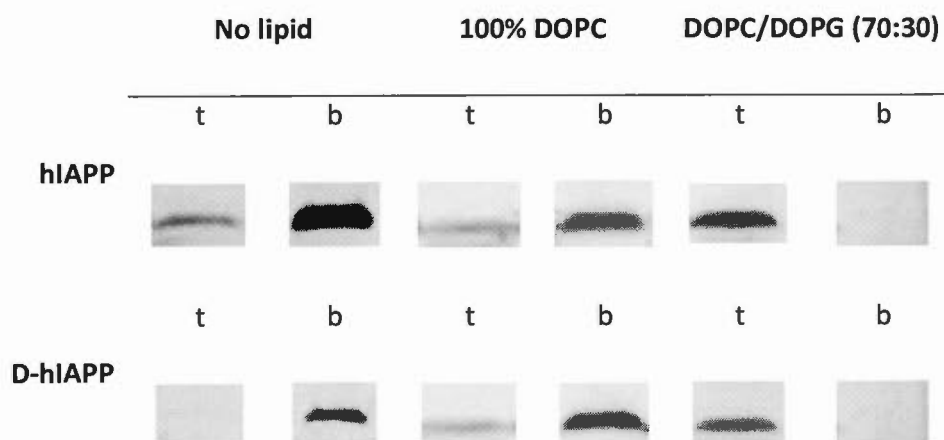
**Figure S5:** Destabilization of rIAPP putative helical segment does not affect its amyloidogenicity. a,b,c) Kinetics of amyloid formation monitored by ThT fluorescence of 50 (a), 25 (b) and 12.5  $\mu\text{M}$  (c) rIAPP (purple) and D-rIAPP (orange) in 10 mM Tris-HCl pH 7.4.



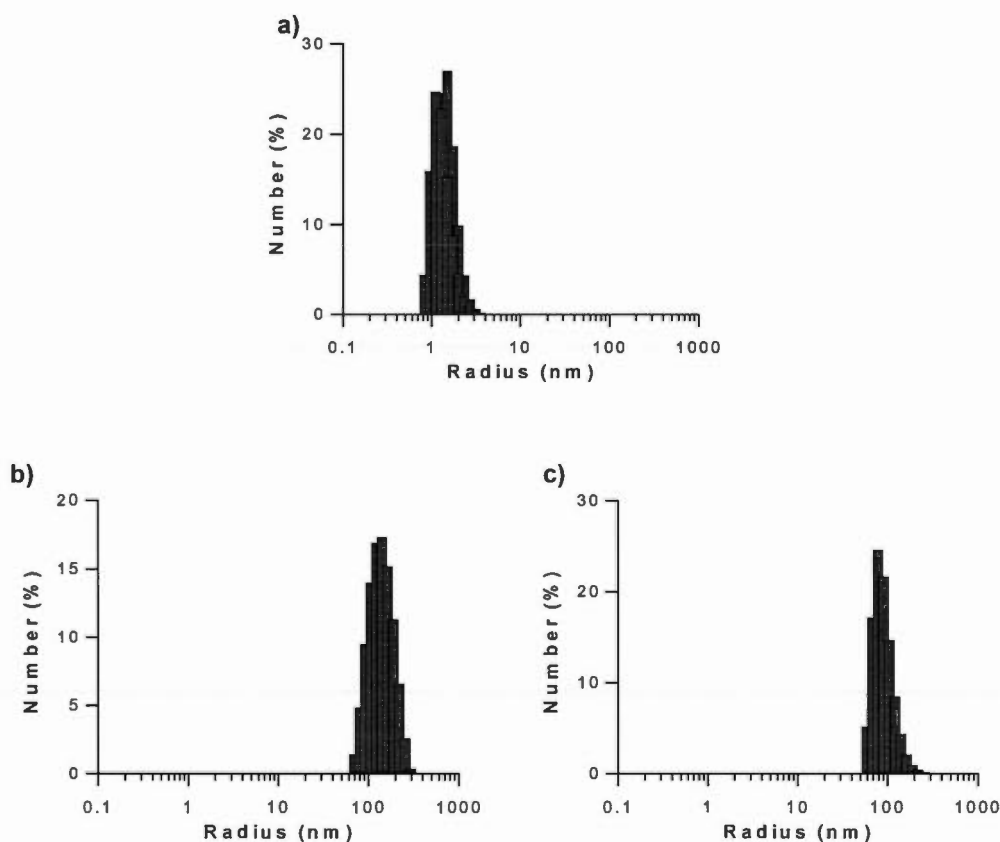
**Figure S6:** Destabilizing hIAPP putative helical domain does not modify the secondary structure of the resulting amyloid fibrils. CD spectra of hIAPP (blue) and D-hIAPP (green) incubated at 50  $\mu$ M for 24 hours at 25°C in 10 mM Tris-HCl pH 7.4.



**Figure S7:** hIAPP and D-hIAPP amyloid seeds have a similar seeding capacity. a,b) Kinetics of 12.5  $\mu$ M hIAPP amyloid formation monitored by ThT fluorescence in absence (blue) or in presence of pre-formed sonicated amyloid seeds of hIAPP (red) and D-hIAPP (green).

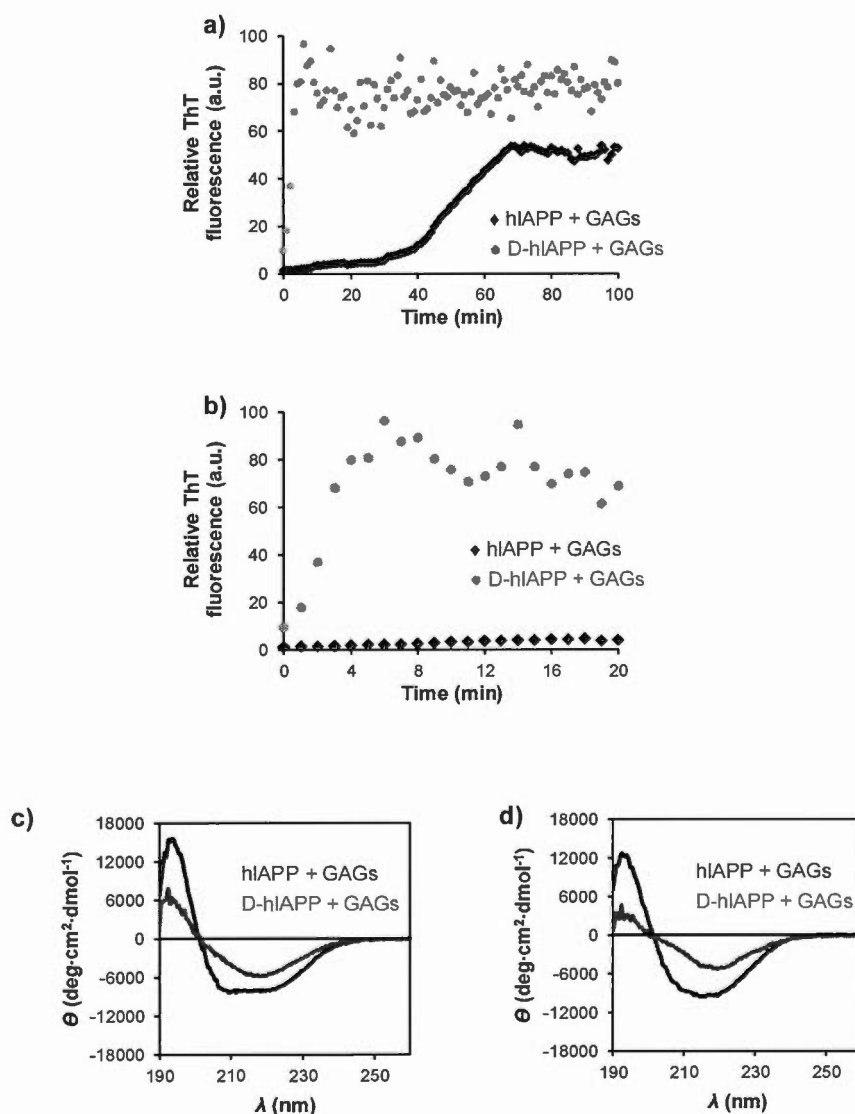


**Figure S8:** hIAPP and D-hIAPP bind anionic LUVs as observed by the flotation assay. hIAPP and D-hIAPP were mixed, or not, with LUVs composed of 100% DOPC or DOPC/DOPG (70:30) and incubated for 10 minutes. Lipid-bound and free peptide were separated by centrifugation in a sucrose gradient. Fractions from the top (t) and the bottom (b) of the centrifuged samples were analyzed by SDS-PAGE and detected by silver staining.

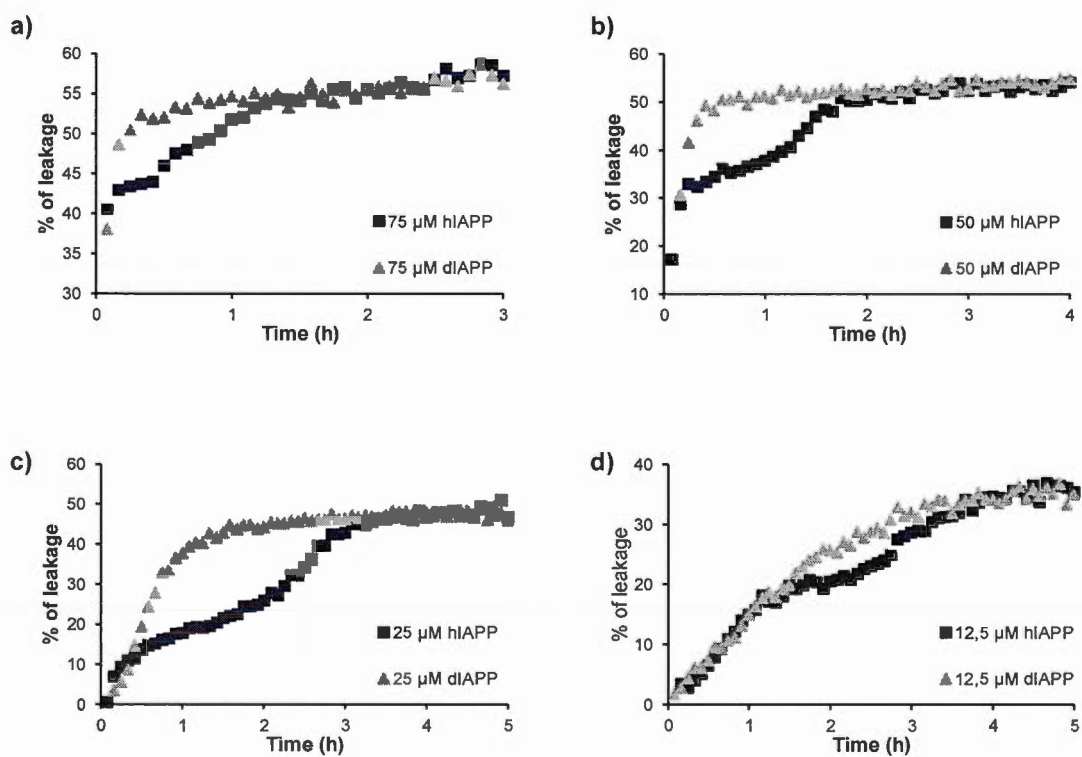


**Figure S9:** Characterization of starting materials by dynamic light scattering. a) Dynamic light scattering analysis of freshly dissolved 50  $\mu\text{M}$  hIAPP (red) and D-hIAPP (grey) in 20 mM Tris, pH 7.4. b) Dynamic light scattering analysis of extruded DOPC/DOPG (7:3) large unilamellar vesicles in 20 mM Tris-HCl pH 7.4. c) Dynamic light scattering analysis of DOPC/DOPG (7:3) large unilamellar vesicles in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 filled with 70 mM calcein.

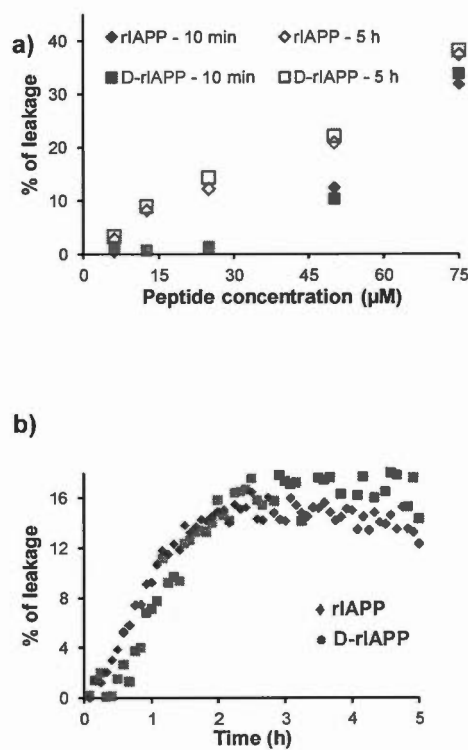




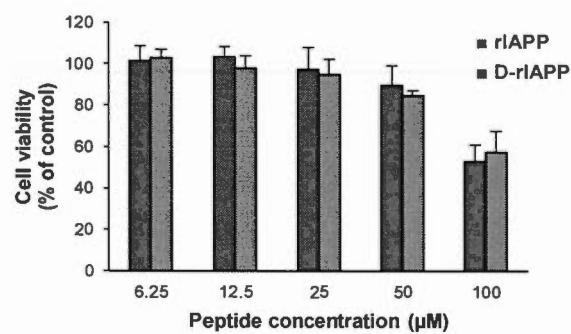
**Figure S10.** Destabilizing hIAPP helical segment potentiates the accelerating effect of sulfated GAGs on amyloid formation. a,b) Kinetics of amyloid formation of 12.5  $\mu\text{M}$  hIAPP (blue) and D-hIAPP (green) in presence of 1.25  $\mu\text{M}$  heparin. The time axis of panel b) is expended 5-fold compared to the time axis of panel a). c,d) CD spectra of hIAPP (blue) and D-hIAPP (green) in presence of heparin before (c) and after (d) 120 minutes incubation.



**Figure S11.** Representative kinetics of membrane leakage of DOPC/DOPG (7:3) LUVs by (a) 75  $\mu\text{M}$ , (b) 50  $\mu\text{M}$ , (c) 25  $\mu\text{M}$ , (d) 12.5  $\mu\text{M}$  hIAPP (blue) and D-hIAPP (green). Notice the differences in the y- and x-axis between each panel.



**Figure S12:** Role of helical intermediates in rIAPP-induced membrane leakage. a) Percentage of membrane leakage of DOPC/DOPG (7:3) LUVs by rIAPP (purple) and D-rIAPP (orange) after 10 min and 5 h incubation. b) Kinetics of membrane leakage of 500  $\mu\text{M}$  DOPC/DOPG (7:3) LUVs by 25  $\mu\text{M}$  rIAPP (purple) and D-rIAPP (orange).



**Figure S13:** Destabilizing rIAPP helical segment does not modify its cytotoxicity on pancreatic  $\beta$ -cells. INS-1 cells were treated with rIAPP (purple) and D-rIAPP (orange) for 24 h and cell viability was measured by the resazurin reduction assay.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Bien que plusieurs études se soient intéressées aux mécanismes de formation de fibres amyloïdes, les changements conformationnels ayant lieu lors de la phase de latence, principalement la formation d'une hélice- $\alpha$  et/ou d'une épingle- $\beta$ , sont encore très controversés. L'hypothèse selon laquelle l'intermédiaire hélicoïdal serait important non seulement dans l'amyloïdogenèse de l'IAPP, mais également dans la cytotoxicité du peptide est largement étudiée. Malgré la grande attention que suscite cette structure intermédiaire, peu de réponses ont été apportées et plus de questions ont été posées.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'intermédiaire hélicoïdal sur l'amyloïdogenèse de l'IAPP en présence de différents milieux ainsi qu'à son rôle dans le processus cytotoxique. Afin d'y parvenir, nous avons développé des dérivés de l'IAPP ayant un ensemble conformationnel restreint. Pour débiter, le but de l'étude était de synthétiser un analogue ayant un domaine hélicoïdal stabilisé. Malheureusement, aucun dérivé ne répondait aux critères. Nous avons donc synthétisé des dérivés de l'IAPP humain (hIAPP) en y substituant consécutivement deux acides aminés par leurs énantiomères de conformation D dans le domaine hélicoïdal du peptide. Cette modification est connue pour déstabiliser la formation de l'hélice- $\alpha$  et ce, sans modifier les propriétés physico-chimiques, telles que l'hydrophobicité et la charge nette du peptide. Parmi les dérivés synthétisés et caractérisés, seul l'analogue [D-Phe<sup>15</sup>, D-Leu<sup>16</sup>] hIAPP (D-hIAPP) affichait les caractéristiques désirées.

hIAPP	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY
D-hIAPP	KCNTATCATQRLANfLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY

**Figure 4.1** Séquence de l'hIAPP et de son analogue conformationnellement restreint, D-hIAPP.

Les acides aminés de conformation D sont représentés en rouge. Ces peptides ont également un pont disulfure entre les Cys2 et Cys7 et leur domaine C-terminal est amidé.

La caractérisation de cet analogue en milieu homogène fut forte intéressante. En effet, les analyses CD ont démontré que l'hIAPP et le D-hIAPP adoptaient une structure désordonnée. Seulement, en présence de faibles pourcentages de trifluoéthanol (TFE), un solvant induisant la formation de structures secondaires en hélice- $\alpha$ , D-hIAPP conserve sa structure désordonnée alors que l'hIAPP adopte rapidement une conformation hélicoïdale. Ainsi, l'incorporation de deux acides aminés de conformation D en position 15 et 16 semble réduire drastiquement la capacité de l'IAPP à adopter une structure secondaire en hélice- $\alpha$ .

Les analyses par AFM et par TEM des fibres amyloïdes matures de l'hIAPP et de son analogue montrent des morphologies différentes. En effet, les fibres de l'hIAPP sont beaucoup plus courtes que celles du D-hIAPP qui peuvent atteindre plus de 5  $\mu\text{m}$  de longueur. Cette différence de morphologie aurait potentiellement un impact sur leurs propriétés structurales. Or, l'analyse CD de ces fibres matures montre un patron similaire sous forme de feuillet- $\beta$ . De plus, les fibres matures des deux peptides ont la capacité de nucléer le processus de formation de fibres amyloïdes de l'hIAPP et ce, de la même façon. Ceci suggère que malgré leurs différences au niveau macroscopique, les fibres de hIAPP et de D-hIAPP ont des propriétés structurales semblables et elles ont la capacité d'interagir avec les espèces intermédiaires de la phase de latence. La principale différence moléculaire entre les deux peptides est la chiralité au niveau des

résidus Phe15 et Leu16. Or, ils se retrouvent sur un des deux brins- $\beta$  intramoléculaires de l'IAPP sous forme de fibre amyloïde. Il semblerait donc que ce changement d'orientation des chaînes latérales entraîne une augmentation de l'affinité des monomères compétents pour les protofibrilles lors de la phase d'élongation.

La cinétique d'agrégation du D-hIAPP, déterminée par l'augmentation de la fluorescence de la ThT, est fortement similaire à celle de l'hIAPP, avec des  $T_{50}$  et des phases de latence presque identiques. Il a également été observé que la similitude entre les  $T_{50}$  se perpétuait avec une hausse de la concentration peptidique. Ceci suggère que les deux peptides ont des espèces intermédiaires peuplant la phase de décalage semblables et utiliseraient une même cascade amyloïdogénique. Afin de répondre à cette hypothèse, une expérience de co-assemblage a été effectuée. Lorsque l'hIAPP et le D-hIAPP étaient mélangés à 6.25  $\mu$ M, la courbe d'agrégation résultante était additive, soit équivalente à une courbe de 12.5  $\mu$ M. De plus, l'analyse par AFM des fibres matures provenant de ce co-assemblage était identique à celles du D-hIAPP seul. Ainsi, il semblerait que les deux peptides possèdent des espèces intermédiaires semblables et que ceux-ci ont la capacité d'interagir ensemble dans la formation de fibres amyloïdes, probablement par une même cascade amyloïdogénique. Toutes ces observations semblent démontrer que l'absence de l'hélice- $\alpha$  ne modifie pas le processus de formation de fibres amyloïdes de l'hIAPP en milieu homogène et que cet intermédiaire hélicoïdal serait une espèce « off-pathway ».

En présence de biomolécules retrouvées au niveau de la membrane plasmique, telles que les bicouches lipidiques et les GAGs sulfatés, l'hIAPP adopte tout d'abord une hélice- $\alpha$  pour ensuite exposer une structure riche en feuillets- $\beta$ , caractéristique des fibres amyloïdes. Au contraire, le D-hIAPP passe directement d'une structure désordonnée à un feuillet- $\beta$ . De plus, le processus amyloïdogénique est accéléré lorsque l'hIAPP est incubé en présence de liposomes de DOPC/DOPG (7 :3) et/ou d'héparine. Toutefois, la phase de latence du D-hIAPP est presque inexistante au contact de ces

biomolécules. Ainsi, l'inhibition de la formation de l'intermédiaire hélicoïdal accélère la formation de fibres amyloïdes en milieu hétérogène, suggérant une fois de plus une espèce « off-pathway ».

Plusieurs études se sont également intéressées à l'impact des changements conformationnels sur l'intégrité membranaire. En effet, le groupe de recherche de Ramamoorthy a démontré que le fragment 1-19 de l'hIAPP, fragment principalement hélicoïdal, semble induire une perturbation membranaire équivalente au peptide complet (Brender et al., 2008). Au contraire, l'hIAPP<sub>20-29</sub> n'induirait que peu de perturbation membranaire, du moins avant l'enclenchement du processus amyloïdogénique, suggérant que la formation de l'hélice- $\alpha$  dans le domaine N-terminal est une conformation importante et critique dans la dégénérescence membranaire (Brender et al., 2013). Ainsi, un essai de perturbation membranaire a été effectué sur l'hIAPP et son analogue contraint. Ceci consiste en l'encapsulation d'un fluorophore à très haute concentration dans des liposomes, occasionnant une inhibition de sa fluorescence. Lorsqu'il y a formation de pores à la membrane, le fluorophore est libéré et sa fluorescence est restaurée. Après 10 minutes et après 5 heures d'incubation, l'hIAPP et le D-hIAPP induisent une perturbation membranaire semblable de façon concentration dépendante. Or, lorsque la cinétique de perturbation membranaire est suivie, deux hausses de fluorescence sont observées pour l'hIAPP. De façon intéressante, la deuxième élévation de fluorescence correspond avec celle de la phase d'élongation de la cinétique d'agrégation du peptide. Ce même résultat avait déjà été rapporté lors d'une étude précédente (Engel et al., 2008; Cao et al., 2013). Ceci suggère que la première phase de la perturbation membranaire serait due aux dépôts et aux interactions entre le peptide et la membrane alors que le moment critique de la perturbation membranaire serait causé par l'élongation des fibres amyloïdes sur la membrane. L'analogue, quant à lui, ne possède qu'une seule élévation de fluorescence, impliquant une perturbation membranaire causée par ce dernier mécanisme. Il



semblerait donc que la perturbation membranaire soit modulée par le processus amyloïdogénique plutôt que par la formation d'une hélice- $\alpha$ .

Chez les patients atteints de diabète de type II, une dégénérescence cellulaire colocalisée avec les fibres amyloïdes d'IAPP a été répertoriée. Ainsi, des traitements au hIAPP et au D-hIAPP appliqués sur des cellules  $\beta$ -pancréatiques (INS-1E) ont montré une toxicité concentration dépendante pour les deux peptides. Par contre, les effets de l'analogue conformationnellement restreint sont plus sévères. Étonnamment, le D-hIAPP induit la mort cellulaire plus rapidement que de l'hIAPP. Alors qu'après quatre heures l'hIAPP est non-toxique pour les cellules, le D-hIAPP cause 20% de mort cellulaire et ce phénomène ne fait que s'aggraver au fil du temps. Afin de confirmer ces observations et d'avoir plus d'indices sur le ou les mécanismes impliqués, l'activation des caspases 3 et 7 ainsi que le niveau de calcium intracellulaire ont été évalués. Le traitement avec le D-hIAPP induit une augmentation de l'activation de la cascade apoptotique menée par les caspases 3/7 après seulement 4 heures, alors qu'une induction significative n'est apparante qu'après 12 heures pour l'hIAPP. Des résultats similaires ont été obtenus pour le niveau de calcium intracellulaire, une des principales caractéristiques de l'induction de l'apoptose. Ainsi, l'intermédiaire hélicoïdal ne causerait pas de toxicité cellulaire par son insertion dans la membrane plasmique mais semble plutôt ralentir le processus cytotoxique.

La communauté scientifique admet généralement que les espèces préfibrillaires retrouvées lors de la phase de latence sont beaucoup plus susceptibles d'induire la dégénérescence cellulaire que les fibres amyloïdes matures. Lorsque l'hIAPP est en présence de membranes modèles de DOPC/DOPG, il présente une phase de latence bien définie d'environ une heure et induit une perturbation membranaire au même moment. Toutefois, l'étude du D-hIAPP montre une phase de latence très courte et une perturbation membranaire tout aussi rapide. Également, le caractère cytotoxique du D-hIAPP est beaucoup plus fort que celui du hIAPP. Or, une formation de fibres

amyloïdes rapide mène à l'obtention des espèces non cytotoxiques rapidement et la dégénérescence cellulaire devrait donc être moindre. C'est du moins ce qui a été observé lors de nos premières études avec les GAGs (Annexe A). L'ajout de GAGs solubles à l'hIAPP menait à l'obtention rapide d'espèces positives au ThT et à une faible cytotoxicité. Ainsi, il est à se demander si la notion d'espèces cytotoxiques est toujours valable et si ce ne serait simplement pas le processus de formation de fibres amyloïdes lui-même qui est la cause de cette mort cellulaire. Ceci expliquerait les résultats de perturbation membranaire et le délai des effets cytotoxiques de l'hIAPP comparativement au D-hIAPP qui induit ces processus plus rapidement. Par ailleurs, d'autres groupes de recherche ont exposé cette hypothèse suivant leurs travaux sur A $\beta$  (Wogulis et al., 2005; Jan et al., 2011). En effet, il a été rapporté que A $\beta$  sous forme soluble et sous forme de fibre mature n'induisait pas la mort cellulaire (Wogulis et al., 2005). Afin d'induire la dégénérescence des neurones, la forme soluble et fibrillaire de A $\beta$ , soit les conditions d'amyloïdogenèse par polymérisation nucléation-dépendante, doivent être présentes. Les mêmes conclusions ont été portées suite à des essais de toxicité des différentes formes de A $\beta$  (Jan et al., 2011). Les isolats de monomères, de protofibrilles et de fibres matures n'induisaient aucune toxicité alors que l'ajout de monomères aux mêmes fractions restaurait la formation de fibres amyloïdes et leur toxicité. Ainsi, le processus de formation de fibres amyloïdes pourrait potentiellement être une plus grande menace que les oligomères préfibrillaires.

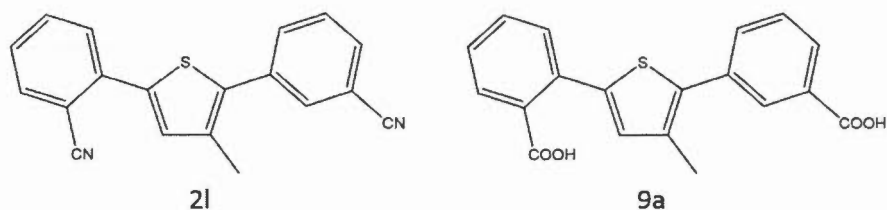
Il est fort intéressant d'observer la différence des résultats obtenus en milieu homogène et en milieu hétérogène. En effet, en solution homogène, l'hIAPP et le D-hIAPP affichent des structures secondaires et des cinétiques d'agrégation identiques. Par contre, lorsque des composantes de la membrane plasmique, telles que les GAGs et les liposomes, sont ajoutées aux peptides, leurs comportements diffèrent. En effet, la cinétique d'agrégation du D-hIAPP devient alors beaucoup plus rapide que celle de l'hIAPP et des changements conformationnels différents se produisent. Il semblerait donc que l'environnement immédiat des protéines et des peptides ait une influence

directe sur leur comportement. Le milieu cellulaire étant complexe et condensé, ils sont en perpétuel contact avec diverses molécules pouvant avoir un impact sur leurs propriétés structurales. Afin d'obtenir des indications plus complètes et plus justes, la présence de conditions physiologiques plus complexes semblerait être une approche plus appropriée pour l'étude *in vitro* des systèmes biologiques.

Chez les patients atteints de diabète de type II, la dégénérescence cellulaire est un évènement critique puisqu'il mène à la perte de masse de cellules  $\beta$ -pancréatiques. L'IAPP aurait un rôle dans cette mort cellulaire. Cependant, le mécanisme utilisé est encore inconnu. Il a été observé de nombreuses fois que l'IAPP induisait des changements morphologiques au niveau de la membrane plasmique, que ce soit une perturbation membranaire ou un bourgeonnement. C'est pourquoi l'utilisation de l'essai de perturbation membranaire est essentielle. Il a non seulement permis de confirmer l'induction de perturbation membranaire par notre peptide, mais a également permis de compléter l'étude comparative avec son dérivé. D'autres groupes de recherche, sceptiques de leurs résultats biophysiques par l'utilisation de membranes modèles, ont effectué les mêmes essais dans différents systèmes; des membranes modèles de POPG, des membranes dérivées de synaptosomes et un modèle cellulaire (Fauvet et al., 2012). Dans les trois cas, le résultat était similaire, suggérant que, bien qu'imparfaits, les systèmes biophysiques sont des approches valables.

Finalement, cette étude suggère grandement que l'intermédiaire hélicoïdal retrouvé au niveau des premiers instants de l'amyloïdogenèse est une espèce « *off-pathway* ». Bien que l'hypothèse où une deuxième voie de formation de fibres amyloïdes impliquant cette conformation secondaire ne soit pas exclue, il est probable que la stabilisation de l'hélice mène à une inhibition du processus amyloïdogénique. De ce fait, le développement de petites molécules organiques capables de lier et de stabiliser le domaine hélicoïdal de l'IAPP apparaît comme une approche prometteuse pour inhiber l'autoassemblage. Lors d'une étude précédente en collaboration avec le Professeur Pat

Forgione de l'Université Concordia, nous avons utilisé des thiophènes comportants différentes substitutions afin d'étudier l'impact de l'hélice- $\alpha$  (Annexe B). Parmi les molécules étudiées, deux ont été retenues pour leur caractéristiques intéressantes. La première, appelée 2l, ralentissait la formation de fibres amyloïdes, mais n'avait aucun impact significatif sur la cytotoxicité du peptide. Au contraire, la molécule 9a accélérail l'amyloïdogenèse de l'IAPP tout en protégeant les cellules  $\beta$ -pancréatiques contre les effets néfastes du peptide. Cependant, nos études n'ont pu déterminer le mode d'action de ces molécules.



**Figure 4.2** Structure des molécule 2l et 9a (Hassanpour et al., 2014).

## CHAPITRE V

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ainsi, un analogue de l'hIAPP ayant un domaine hélicoïdal déstabilisé a été développé et a permis l'étude du rôle de l'intermédiaire hélicoïdal dans le processus de formation de fibres amyloïdes. L'analogue D-hIAPP a la capacité d'induire le processus amyloïdogénique autant en milieu homogène qu'en présence de GAGs et de membranes modèles. Les deux peptides ont également la capacité d'induire une perturbation membranaire de façon concentration dépendante qui corrèle avec leur cinétique amyloïdogénique. De plus, bien qu'il ait l'incapacité d'adopter une hélice- $\alpha$  transitoire, D-hIAPP accentue et accélère les effets cytotoxiques et pro-apoptotiques sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Il semblerait donc que la formation d'une hélice- $\alpha$  dans les premiers moments du processus amyloïdogénique ne soit pas indispensable à la formation de fibres amyloïdes et au caractère cytotoxique de l'IAPP. Bien qu'une deuxième voie d'amyloïdogénèse impliquant l'intermédiaire hélicoïdal ne soit pas écartée, il s'agirait d'une espèce « *off-pathway* ». Sa stabilisation mènerait probablement à l'inhibition de la formation de fibres amyloïdes. Il s'agirait donc d'une bonne avenue d'approches thérapeutiques. Ainsi, en stabilisant l'hélice- $\alpha$  à l'aide de modifications intramoléculaires ou encore grâce à l'utilisation de petites molécules, il serait fort probable d'observer un ralentissement de la cinétique d'agrégation et un effet protecteur au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques.

Lors de futures études, il serait intéressant de synthétiser un analogue de l'IAPP ayant un domaine hélicoïdal stabilisé par une liaison covalente, comme un pont lactame, ou

électrostatique avec l'aide d'une petite molécule. Il serait alors possible d'étudier l'impact de cet intermédiaire dans l'amyloïdogenèse et la cytotoxicité de l'IAPP. De plus, l'incorporation d'un marqueur fluorescent sur l'hIAPP et le D-hIAPP permettrait d'étudier leurs comportements en milieu cellulaire par microscopie à fluorescence. Il serait intéressant d'observer l'impact de l'inhibition de la formation de l'hélice- $\alpha$  sur leur parcours au travers la cellule, leurs lieux de dépôt et, si possible, leur(s) mécanisme(s) de perturbation membranaire.

## ANNEXE A

### ARTICLE II : NEW INSIGHTS INTO THE ROLES OF SULFATED GLYCOSAMINOGLYCANS IN ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE AMYLOIDOGENESIS AND CYTOTOXICITY

## New Insights Into the Roles of Sulfated Glycosaminoglycans in Islet Amyloid Polypeptide Amyloidogenesis and Cytotoxicity

Carole Anne De Carufel, Phuong Trang Nguyen, Sabrina Sahnouni, Steve Bourgault  
Department of Chemistry, University of Québec in Montreal, Montreal, QC H3C 3P8, Canada

Received 20 December 2012; revised 11 March 2013; accepted 17 March 2013

Published online 22 March 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22243

### ABSTRACT:

Glycosaminoglycans (GAGs) are found in association with virtually all extracellular protein deposits related to amyloid diseases. Particularly, GAGs were shown to enhance fibrillogenesis of the islet amyloid polypeptide (IAPP), a peptide hormone whose aggregation is associated with Type-II diabetes pathogenesis. However, the exact molecular mechanism by which GAGs enhance IAPP amyloidogenesis remains unclear as well as the implications of cell surface GAGs in IAPP-mediated cytotoxicity. The aim of this study was to gain conformational and thermodynamics insights about GAGs-IAPP interactions as a function of IAPP protonation state and buffer ionic strength as well as to explore the roles of cell surface GAGs in IAPP cytotoxicity. Isothermal titration calorimetry revealed that protonation of residue His<sup>18</sup> increases the binding affinity of IAPP towards heparin and, in turn, strongly stimulates fibrillogenesis. Interaction of IAPP with heparin induces a random coil to helix conformational conversion and the helical intermediates could be on-pathway to amyloid fibrils formation. Using rat beta-cells INS-1 that were enzymatically treated with GAG lyases and a CHO cell line that is deficient in the biosynthesis of GAGs, we observed that the lack of GAGs at the plasma membrane does not prevent IAPP-induced toxicity, whereas the presence of soluble heparin in the cell media inhibits IAPP cytotoxicity. Overall, this study

reinforces the postulate that sulfated GAGs are actively implicated in IAPP amyloidogenic process in vivo, where they could play a protective role by interacting with cytotoxic species and converting them into less culprit amyloid fibrils. © 2013 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers* (Pept Sci) 100: 645–655, 2013.

**Keywords:** islet amyloid polypeptide; amyloid; glycosaminoglycan; conformation; pancreatic beta-cells

This article was originally published online as an accepted preprint. The "Published Online" date corresponds to the preprint version. You can request a copy of the preprint by emailing the *Biopolymers* editorial office at [biopolymers@wiley.com](mailto:biopolymers@wiley.com)

### INTRODUCTION

Protein aggregation and amyloid deposition are associated with numerous human diseases, including Alzheimer's disease, Type-II diabetes (DM-2) as well as the transthyretin (TTR) and the light chain amyloidoses.<sup>1</sup> These protein misfolding disorders differ by the identity of the protein that accumulates into insoluble aggregates and by the tissue(s) afflicted by the deposition-associated degeneration.<sup>2</sup> More than 30 human proteins sharing no primary sequence or structural homology are known as precursors of amyloid fibrils. Nonetheless, amyloid deposits share common structural, chemical, and biological features, such as an extensive cross- $\beta$ -sheet quaternary structure, the ability to bind selectively thioflavin T (ThT) and Congo Red dyes and the association with nonfibrillar molecules, including the serum amyloid P component, apolipoprotein E, lipids, and sulfated glycosaminoglycans (GAGs).<sup>1</sup> Particularly, GAGs, which are long unbranched polysaccharides prevalent in the extracellular matrix and at the cell surface, are virtually associated to all amyloid deposits,<sup>3</sup>

Correspondence to: Pr. Steve Bourgault, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada; e-mail: [bourgault.steve@uqam.ca](mailto:bourgault.steve@uqam.ca)  
© 2013 Wiley Periodicals, Inc.



including those from TTR,<sup>4</sup>  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ),<sup>5</sup> and islet amyloid polypeptide (IAPP).<sup>6</sup> Besides, several *in vitro* studies have shown that sulfated GAGs accelerate the aggregation of amyloidogenic polypeptides, including natively globular proteins such as TTR<sup>7</sup> and  $\beta$ 2-microglobulin<sup>8</sup> as well as intrinsically disordered peptides, such as A $\beta$ ,<sup>9</sup> gelsolin fragments<sup>10</sup> and IAPP.<sup>11</sup> Mechanistic investigations have suggested that sulfated GAGs, particularly heparan sulfate (HS) and its highly-sulfated derivative heparin, accelerate amyloidogenesis by a scaffold-based mechanism, in which the monomeric precursors<sup>12</sup> and/or the oligomeric species<sup>7</sup> interact electrostatically with the sulfate moieties of the polysaccharides, increasing local concentrations and promoting fibrillization. Recently, it has been shown that HS induces the rapid conversion of human muscle acylphosphatase into oligomers upon the binding of the monomeric protein to sulfated domain of HS.<sup>13</sup> In addition, it has been reported that GAGs accelerate the random-coil-to- $\beta$ -sheet conformational transition of natively unfolded polypeptides, such as gelsolin<sup>14</sup> and A $\beta$ ,<sup>9</sup> although this structural modification is most likely related to the aggregation process rather than to a conformational change of the monomeric peptide. Surprisingly, although sulfated GAGs are well-known to accelerate the fibrillogenesis of intrinsically disordered amyloidogenic peptides, such as A $\beta$  and IAPP, data concerning the effects of GAGs on the conformational transition of the monomeric and/or the early oligomeric species are still sparse.

IAPP (K<sup>1</sup>CNTATCATQR<sup>11</sup>LANFIVH<sup>18</sup>SSNNFGAILSSTNVGSNTY<sup>37</sup>) is a natively disordered 37-residue peptidic hormone that is cosynthesized, copackaged, and cosecreted with insulin in a molar ratio of 1:100 by pancreatic islet  $\beta$ -cells.<sup>15</sup> The functions of IAPP are not clearly understood although it is known that IAPP, in its soluble form, acts as a glucomodulatory hormone that inhibits glucose uptake and glucose-stimulated insulin secretion.<sup>15</sup> Particularly, IAPP is an unusual aggregation-prone peptide that forms amyloid fibrils in the islets of Langerhans of DM-2 subjects. The presence of protein deposition correlates closely with the duration and the severity of the disease. The amyloidogenic process observed in the pancreas is believed to accelerate the pathogenesis of DM-2 by exacerbating  $\beta$ -cell degeneration and, therefore, ultimately compromising insulin secretion.<sup>16</sup> In fact, when applied to pancreatic  $\beta$ -cells in culture, IAPP induces cell death<sup>17</sup> by mechanisms that are still not clearly understood. IAPP rarely deposits in the pancreas of normal individuals, although it is expressed in nondiabetic subjects at concentration sufficiently high to form amyloid fibrils. This suggests that other factors such as GAGs, lipids, oxidative stress, or deficiency of  $\beta$ -cell proteostasis network could trigger IAPP amyloidogenesis in

diabetic patients. Since the original work of Castillo et al.,<sup>11</sup> a few other mechanistic studies have focused on the effects of sulfated GAGs on IAPP<sup>18,19</sup> and Pro-IAPP<sup>20,21</sup> amyloidogenesis. These studies have highlighted the importance of the polymeric and anionic nature of heparin in the accelerating effects on IAPP fibrillogenesis<sup>19</sup> and have shown that the heparin binding site is principally located within the positively charged N-terminal domain of IAPP<sup>19</sup> and proIAPP.<sup>21</sup> Interestingly, Wang et al. have recently reported that GAGs can induce the formation of amyloid fibrils from well-known nonamyloidogenic variants of IAPP, such as the I26P-IAPP and the [N-MeGly<sup>22</sup>, N-Me-Ile<sup>23</sup>]IAPP.<sup>16</sup> Moreover, short heparin fragments, from 2 to 8 saccharide units, were efficient to protect MIN6 mouse pancreatic cells from IAPP-induced cytotoxicity, although the disaccharide dp2 had no effect on IAPP aggregation.<sup>19</sup> Nonetheless, several major issues regarding the mechanisms of action of sulfated GAGs in IAPP amyloidogenesis and cytotoxicity are still unknown, including the conformational and thermodynamics aspects of IAPP binding to heparin as well as the roles of the GAGs located at the cell surface in IAPP-induced toxicity.

In the present study, we have initially investigated the effects of heparin, employed as a model of the sulfated regions of HS, on IAPP amyloid fibril formation as a function of the protonation state of residue His<sup>18</sup>. In addition, we have studied the interactions between IAPP and heparin by circular dichroism (CD) spectroscopy and by isothermal titration calorimetry (ITC) at pH 5.5 and 7.4. Our results demonstrate that protonation of the imidazole moiety of His<sup>18</sup> strongly increases the binding affinity of IAPP towards heparin, allowing the amyloidogenic process to occur efficiently at a pH that is usually unfavorable to IAPP amyloid fibril formation. Moreover, we have observed that the binding of IAPP to heparin induces the transient formation of helical intermediates, which could be on-pathway to amyloid fibrils. Herein, we have also shown that the lack of GAGs on the outer face of the plasma membrane does not prevent IAPP toxicity, whereas the presence of soluble heparin in the culture media suppresses the cytotoxicity of IAPP.

## RESULTS

### Effect of Heparin on IAPP Fibrillogenesis

The effect of the protonation state of IAPP on sulfated GAGs-accelerated amyloidogenesis was initially investigated. Depending on the protonation state of the N-terminal amine function, IAPP displayed 2 or 3 positive charges at pH of 7.4 (Lys<sup>1</sup>, Arg<sup>11</sup>) and no negative charge, as the C-terminus is amidated and IAPP has no negatively charged residue. In contrast, at pH 5.5, IAPP carried a total net charge of +4, owing to the protonation of His<sup>18</sup>. To monitor the kinetics of amyloid fibril

formation, we employed the fluorescent dye thioflavine T (ThT), which exhibits a strong increase of its fluorescence quantum yield upon its binding to cross- $\beta$ -sheet quaternary structure.<sup>24</sup> When 25  $\mu$ M IAPP was incubated quiescently at pH 5.5 (20 mM MES), no increase of ThT fluorescence was observed (Figure 1A), suggesting that IAPP is poorly amyloidogenic in these conditions. In contrast, at pH 7.4 (20 mM Tris) IAPP aggregated with a well-defined lag-phase, during which ThT-negative species mostly populate,<sup>25</sup> followed by an elongation phase of the amyloids and a plateau (Figure 1B). The addition of heparin (2.5 and 0.625  $\mu$ M) virtually eliminated the lag phase, increased drastically the rate of fibril growth and led to a higher ThT fluorescence at the end of the experiment at both pH 5.5 and 7.4 (Figures 1A and 1B). Heparin used in this study has a molecular weight of  $17 \pm 2$  kDa (46–58 monosaccharide units) and an average of 1.6–3 sulfate groups per disaccharide repeat unit. It has been previously observed by transmission electron microscopy (TEM) that the presence of sulfated GAGs in the aggregation mixture stimulates the formation of longer fibrils of proIAPP<sub>1–48</sub>.<sup>20</sup> Moreover, IAPP fibrils grown in presence of long heparin fragments have appeared to be qualitatively more abundant and longer as compared to IAPP fibrils prepared in absence of sulfated GAGs.<sup>19</sup> These previous studies suggest that a larger amount of amyloids are formed in presence of 0.1 and 0.025 equivalent heparin and that these amyloid fibrils can also be better defined and longer. It is worth mentioning that the ThT fluorescence signal of the samples containing 2.5 and 0.625  $\mu$ M heparin at pH 7.4 (Figure 1B) were truncated after 10 h as the signal started to be very chaotic, most likely because large aggregates start to sediment, interfering with the fluorescence measurement. Surprisingly, at a molar ratio of 1:100 (heparin:IAPP), heparin partially inhibited IAPP aggregation at pH 7.4, as revealed by the increase of the lag phase and the significant decrease of the rate of amyloid fibril growth (Figure 1B). Addition of 0.25  $\mu$ M heparin into the aggregation mixture at pH 5.5 did not enhance IAPP amyloidogenesis (Figure 1A). Taken together, these results confirm that heparin potentially accelerates fibrillogenesis, even in condition (pH 5.5) that does not efficiently allow the formation of amyloid fibrils from homogeneous IAPP solution.

Since the binding of amyloidogenic polypeptides to sulfated GAGs is mainly mediated through electrostatic interactions,<sup>7,10</sup> the proaggregating effect of heparin in presence of 150 mM NaCl was analyzed. As the ionic strength was increased, IAPP amyloidogenesis, in absence of heparin, was significantly stimulated, at both studied pH. At pH 5.5, a lag phase of around 10 h was observed (Figure 2A), whereas at pH 7.4, the  $t_{50}$ , i.e., the time required for the ThT signal to reach half of its maximal value, was decreased to less than 5 h (Figure 2B).

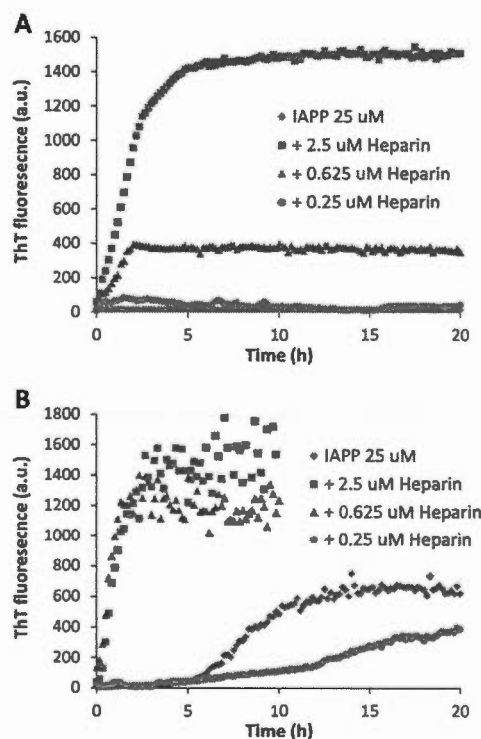
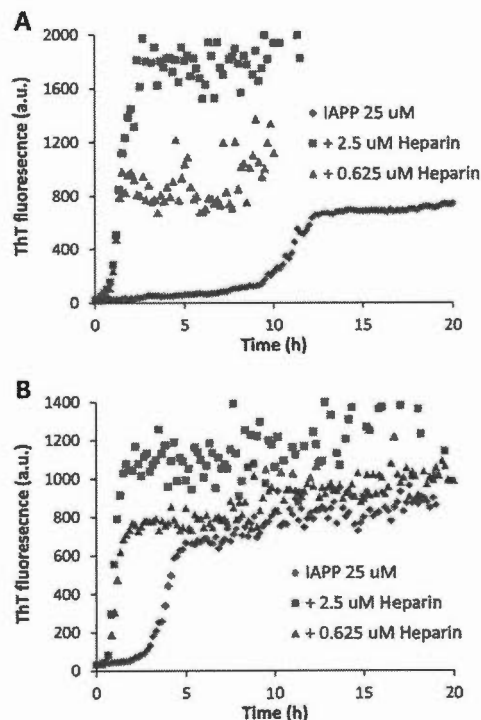


FIGURE 1 Effect of heparin on IAPP kinetics of amyloid fibril formation monitored by ThT fluorescence. IAPP (25  $\mu$ M) was incubated in (A) 20 mM MES, pH 5.5, or in (B) 20 mM Tris, pH 7.4, at 25°C without agitation in the absence (◆, blue) or in the presence of 2.5  $\mu$ M (■, red), 0.625  $\mu$ M (▲, green), or 0.25  $\mu$ M (●, purple) heparin. ThT fluorescence (40  $\mu$ M) was measured every 10 min over the course of 20 h, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.

Again, ThT fluorescence signal of the samples containing 2.5 and 0.625  $\mu$ M heparin at pH 5.5 (Figure 2A) were truncated after 10 h as the signal started to be very chaotic. These results are in agreement with the recent work of Marek et al.,<sup>22</sup> which shows that IAPP fibrillogenesis is strongly dependent on ionic strength, with increasing concentration of NaCl leading to a reduction of the lag phase. They ascribed the accelerating effect at ionic strengths of 110 to 410 mM to a convolution of direct anion binding and electrostatic screening.<sup>22</sup> The stimulating effect of heparin on IAPP amyloidogenesis was also observed in presence of 150 mM NaCl at both studied pH. A very short lag phase, an increasing rate of the growth phase and a higher final ThT fluorescence signal were detected in presence of



**FIGURE 2** Effect of ionic strength on heparin-accelerated IAPP amyloid fibril formation. IAPP (25  $\mu\text{M}$ ) was incubated in (A) 20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 5.5, or in (B) 20 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.4, at 25°C without agitation in the absence ( $\blacklozenge$ , blue) or in the presence of 2.5  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ , red) or 0.625  $\mu\text{M}$  ( $\blacktriangle$ , green) heparin. ThT fluorescence (40  $\mu\text{M}$ ) was measured every 10 min over the course of 20 h, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.

2.5 and 0.625  $\mu\text{M}$  heparin (Figures 2A and 2B). In contrast to aggregation kinetics performed in low ionic strength, an apparent lag-phase of  $\sim 30$  min was observed. This dissimilarity suggests that binding of monomeric IAPP to heparin is significantly weaker at higher salt concentration, slowing down the formation of ThT-positive quaternary species, an avenue that we addressed herein by ITC.

#### Effect of Heparin on IAPP Conformational Ensemble

Conformational changes of IAPP induced by its interaction with heparin were investigated by CD spectroscopy. The CD spectra of monomeric IAPP (25  $\mu\text{M}$ ) that had been solubilized in either Tris (pH 7.4) or MES (pH 5.5) (approximated dead time of 10 s) were mainly characteristic of a random coil

conformation with a single minimum around 200 nm (Figures 3A and 3B). This result is consistent with the natively disordered structure of monomeric IAPP in aqueous solution.<sup>26</sup> In presence of 0.1 eq. heparin, IAPP displayed CD spectra with two minima at around 208 and 222 nm and a maximum at around 195 nm, suggesting that binding of IAPP to heparin induces the formation of a helical conformation. At a 1:40 molar ratio (heparin:IAPP), CD spectrum at pH 7.4 (Figure 3B) was partially characteristic of a  $\beta$ -sheet conformation, although the minimum was red shifted in comparison to classical  $\beta$ -sheet secondary structure. After 16 h incubation at 25°C, CD spectra were collected again. IAPP at pH 5.5 and in absence of heparin still mainly adopted an unstructured conformation (Figure 3C), in agreement with the ThT-negative signal (Figure 1A). In contrast, IAPP at pH 7.4 showed a CD spectrum characteristic of a  $\beta$ -sheet rich structure (Figure 3D), consistent with the ThT-positive signal observed at the end of the elongation phase (Figure 1B). In presence of 2.5  $\mu\text{M}$  heparin, CD spectra taken after 16 h incubation revealed mainly a  $\beta$ -sheet structure displaying a minimum around 216 nm. Nonetheless, the broad minimum between 212 and 220 nm as well as the strong positive signal at around 195 nm suggest overlapping of  $\alpha$ -helical contributions. At pH 5.5 and at a molar ratio of 1:40 (heparin:IAPP), the CD signal before (0 h) and after (16 h) incubation was unclear and weak. This could be related to light scattering caused by the fast aggregation and/or precipitation of IAPP-heparin complexes, as total charge neutralization could be approximately obtained at this molar ratio. Overall, our CD investigation revealed that IAPP binding to heparin induces a random coil to  $\alpha$ -helix conformational transition and this helical intermediate could be on-pathway to the formation of  $\beta$ -sheet rich species observed after 16 h incubation.

#### Binding of IAPP to Heparin Studied by Isothermal Titration Calorimetry

We then used ITC to get some insights about the thermodynamics of IAPP binding to heparin as a function of pH and ionic strength. Figure 4A, top panel, shows a representative calorimetric heat flow trace obtained by the titration of IAPP with heparin at 25°C at pH 5.5. IAPP solution (50  $\mu\text{M}$ ) was filled in the calorimeter cell and 10  $\mu\text{l}$  of heparin solution (15  $\mu\text{M}$ ) were injected every 10 min. The downward direction of the titration peaks indicated that binding of IAPP to heparin is an exothermic reaction at 25°C. The reaction heats represented in the lower panel were obtained by integrating the titration peaks and were corrected for the heats of dilution of heparin into the corresponding buffer. The heats measured in the first injections were relatively constant, since the whole injected

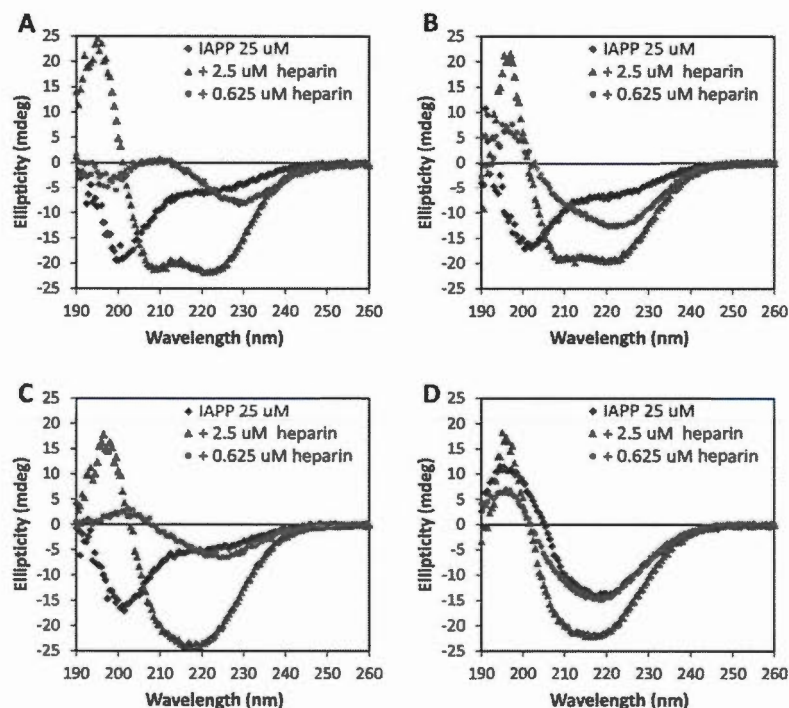


FIGURE 3 Far UV circular dichroism spectra of IAPP. CD spectra of 25  $\mu$ M IAPP ( $\blacklozenge$ , blue) in absence or in presence of 2.5  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ , green) or 0.625  $\mu$ M ( $\bullet$ , red) heparin in 20 mM MES, pH 5.5 (A, C) or in 20 mM Tris, pH 7.4 (B, D) at 25°C. (A) and (B) were taken immediately after solubilizing monomerized-lyophilized IAPP (dead time of 10 s) whereas (C) and (D) were taken after 16 h incubation at 25°C without agitation.

heparin (1.5 nmol per injection, except for a 0.3 nmol initial injection) was bound to IAPP, as the peptide was much in excess over the GAG. As the concentration of heparin in the calorimeter cell increased, the proportion of unbound IAPP decreased and the heats of reaction became smaller. The integrated peaks were fit to a model of independent identical binding sites, where IAPP was considered as the ligand. In the experiment performed at pH 5.5, the thermodynamics parameters obtained were an enthalpy of  $\Delta H_{\text{IAPP}} \approx -4.3$  kcal/mol and an entropy of  $\Delta S_{\text{IAPP}} \approx 16.9$  kcal/mol/deg. This suggests that binding is predominantly enthalpy-driven, most likely through electrostatic interactions, whereas the contribution of entropy is modest. The obtained binding constant ( $K$ ) of  $7.08 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  corresponded to a dissociation constant in the low micromolar range (0.1–0.2  $\mu$ M), suggesting high affinity of IAPP to heparin at pH 5.5. These thermodynamics and

kinetics parameters should be interpreted with care, as several processes, such as conformational transition and changes in the IAPP:heparin molar ratio due to aggregation, were underway in the course of the ITC assay. The binding stoichiometry ( $s$ ) was evaluated at 32.9, providing an approximation of the number of IAPP molecules bound per heparin, based on an average molecular weight of 17 kDa for heparin.

When ITC experiment was performed at pH 7.4, the observed binding affinity of heparin to IAPP decreased drastically (Figure 4B). The binding constant ( $K$ ) is  $\approx 3.63 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , indicating a 20-fold reduction in the binding affinity of IAPP for heparin at pH 7.4 as compared to pH 5.5. Particularly, the enthalpy was significantly reduced at pH 7.4 ( $\Delta H_{\text{IAPP}} \approx -1.6$  kcal/mol), implying a decrease of electrostatic interactions between the peptide and the GAG. These results confirm the key role of the electrostatic interactions in IAPP-heparin

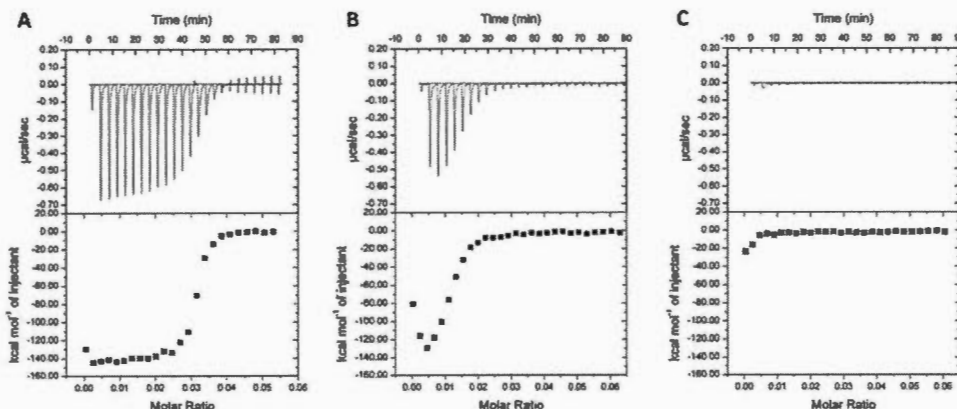


FIGURE 4 Titration of heparin into IAPP. Calorimetric traces and integrated heats of reaction obtained at 25°C by the titration of heparin (15  $\mu$ M) into a solution of IAPP (A) (50  $\mu$ M) in 20 mM MES, pH 5.5, or (B) 20 mM Tris, pH 7.4, or (C) in 20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 5.5. Heats of reaction (bottom panels) were integrated from the calorimetric trace and plotted as a function of heparin/IAPP molar ratio.

binding and indicate that the protonation of the imidazole ring of His<sup>18</sup>, and perhaps the N-terminus, at pH 5.5 strongly favors the binding of IAPP to heparin. As expected for electrostatic interactions, the binding affinity of IAPP decreased drastically with increasing ionic strength of the buffer. At a salt concentration of 150 mM NaCl, no significant heats of binding was detected either pH 5.5 (Figure 4C) or pH 7.4 (data not shown). This result is somehow surprising as a strong proamyloidogenic effect of heparin was observed in presence of 150 mM NaCl (Figure 2).

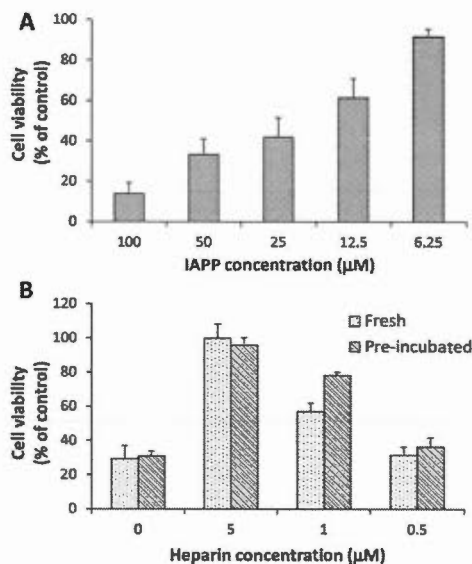
#### Inhibition of IAPP-Mediated Cytotoxicity by Heparin

It is known that when IAPP is added to the cell culture media of pancreatic  $\beta$ -cells, it induces cellular death.<sup>17,19,23</sup> We initially confirmed the cytotoxic effects of various IAPP concentrations on the viability of INS-1 cells by means of the resazurin metabolic assay. When IAPP was freshly dissolved in 20 mM Tris pH 7.4, immediately before being incorporated to the cell media, it decreased cellular viability after 24 h incubation in a concentration-dependant manner (Figure 5A). A similar cytotoxicity was observed when IAPP was preincubated at 3 $\times$  for 16 h (20 mM Tris pH 7.4) at room temperature before cell treatment (data not shown). The effect of heparin on IAPP-mediated toxicity was then investigated using two different approaches. In the first approach (Fresh), IAPP was freshly prepared at 150  $\mu$ M (3 $\times$ ) immediately before cell treatment.

Simultaneously, heparin solution was prepared at 100 $\times$  stock solutions and added to the cell culture to the final desired concentrations (5–0.5  $\mu$ M). Using this approach of coapplication of fresh solutions (Figure 5B; Fresh), we observed that a high concentration of heparin (5  $\mu$ M) was necessary to totally counteract the toxicity induced by 50  $\mu$ M IAPP. At a molar ratio of 1:50 (heparin:IAPP) and below, heparin demonstrated partial or no protecting effects on IAPP-cytotoxicity. In the second approach (Preincubated), IAPP and heparin were preincubated for 16 h before cell treatment. Using this procedure, we observed a significant protecting effect at a final concentration of heparin of 5  $\mu$ M, whereas at 1  $\mu$ M, heparin was partially protective and at a 1:100 molar ratio, heparin displayed no significant protecting effect on IAPP-induced toxicity (Figure 5B; Preincubated).

#### Role of Cell Surface GAGs in IAPP-Mediated Cytotoxicity

To assess the possible implication of GAGs located on the outer leaflet of the plasma membrane in IAPP-mediated cytotoxicity, we subjected cell surface GAGs to enzymatic digestion prior to IAPP treatment. INS-1 cells were pre-treated for 24 h with a high concentration of heparinase I (1 U/ml) and chondroitinase ABC (0.5 U/ml) in serum-free media before IAPP treatment, also performed in presence of GAGs lyases. According to previous studies,<sup>27</sup> this enzymatic treatment should allow the complete digestion of cell surface GAGs. We observed similar

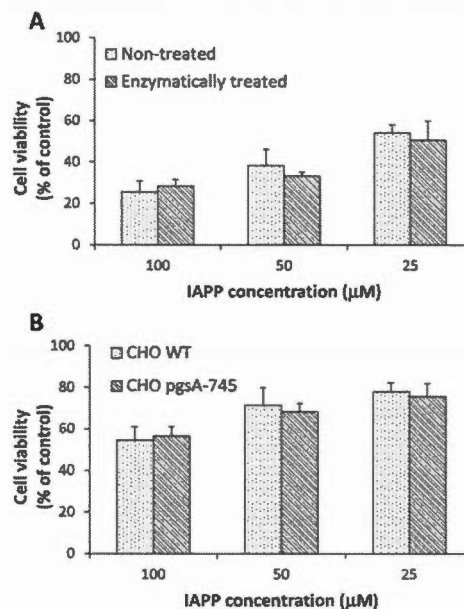


**FIGURE 5** Inhibition of IAPP-induced cytotoxicity on rat INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells by heparin. (A) INS-1 cells were treated with concentrations of IAPP ranging from 100 to 6.25  $\mu$ M for 24 h and cell viability was measured by the resazurin reduction assay and compared to cells treated with vehicle only (100% cell viability). (B) INS-1 cells were treated with 50  $\mu$ M IAPP in absence or in presence of heparin (5–0.5  $\mu$ M). (Fresh) IAPP was freshly dissolved in 20 mM Tris, pH 7.4, at 150  $\mu$ M and 50  $\mu$ l was immediately incorporated into 100  $\mu$ l cell media and heparin was added directly to the culture media simultaneously. (Preincubated) IAPP was incubated at 150  $\mu$ M (3 $\times$ ) without or with 15, 3, or 0.3  $\mu$ M heparin (3 $\times$ ) in 20 mM Tris, pH 7.4. After 24 h of incubation at room temperature, 50  $\mu$ l of IAPP solution (with or without heparin) was added to the cell media and the cell viability was measured after 24 h of incubation by the resazurin metabolic assay.

cell viability for enzymes-treated cells and for mock-treated cells, suggesting that the lack of GAGs on the surface of INS-1 cells does not prevent IAPP toxicity (Figure 6A). To confirm the results obtained with the INS-1 cells treated with heparinase and chondroitinase, we included a mutant CHO cell line to our study; CHO pgsA-745 cells, which lack GAGs as a result of a deficiency in xylosyltransferase, a key enzyme in GAGs biosynthesis.<sup>28</sup> IAPP, freshly applied to wild-type CHO, induced a concentration-dependant decrease of cell viability (Figure 6B), although the observed loss of cell viability was significantly lower as compared to INS-1 cells. Similar results were obtained for GAGs-deficient CHO pgsA-745 cells (Figure 6B), strongly suggesting that cell surface GAGs are not implicated in IAPP-mediated cytotoxicity.

## DISCUSSION

IAPP amyloid fibrils are found in the extracellular space of the islets of Langerhans of patients afflicted by DM-2 where they are closely associated with proteoglycans.<sup>6</sup> Biophysical studies have shown that sulfated GAGs stimulate the fibrillogenesis of IAPP,<sup>11,19,29</sup> proIAPP,<sup>20</sup> and nonamyloidogenic variants of IAPP.<sup>18</sup> To better understand the mechanistic basis of heparin-accelerated IAPP amyloidogenesis and the implications of GAG moieties of cell surface proteoglycans in IAPP-mediated  $\beta$ -cells degeneration, we characterized thermodynamically and structurally IAPP-heparin interaction as a function of IAPP protonation state and we investigated the roles of heparin in IAPP-induced cytotoxicity. Kinetics aggregation assay monitored by ThT fluorescence, revealed that IAPP amyloidogenesis is inefficient at pH 5.5, most likely as a result of the positive



**FIGURE 6** Effect of cell surface glycosaminoglycans on IAPP-mediated cytotoxicity. (A) INS-1 cells were treated or not with 1 U/ml heparinase I and 0.5 U/ml chondroitinase ABC in serum-free complete RPMI-1640 medium for 24 h before treatment with freshly prepared IAPP (dissolved at 3 $\times$  of the final concentration in 20 mM Tris, pH 7.4). After 24 h incubation in absence or in presence of IAPP (serum free RPMI-1640 medium, 1 U/ml heparinase I and 0.5 U/ml chondroitinase ABC), cell viability was measured by the resazurin reduction assay. (B) Wild-type CHO cells (CHO WT) and GAGs deficient cells (CHO pgsA-745) were treated with freshly prepared IAPP (dissolved at 3 $\times$  of the final concentration in 20 mM Tris, pH 7.4) for 24 h and cell viability was measured by the resazurin reduction assay.



charge on His<sup>18</sup>. The fact that His<sup>18</sup> protonation does not allow the efficient formation of amyloid fibrils in low ionic strength buffer is consistent with the X-ray structural model of Eisenberg,<sup>30</sup> which stipulates that the imidazole ring is buried inside the loops. Nonetheless, in the NMR model of Tycko,<sup>31</sup> His<sup>18</sup> side chain extends outward of the core and according to this model, His<sup>18</sup> protonation could slow down fibrillogenesis by counteracting protofilament assembling. Jha et al.,<sup>19</sup> have recently described, using NMR, that heparin binds to the positively charged N-terminal domain of IAPP and they ascribed the proaggregating effects of heparin derivatives to charge neutralization that renders the peptide more hydrophobic. This charge neutralization mechanism would allow the efficient elongation of IAPP fibrils on heparin scaffold. In this view, it has been shown for IAPP,<sup>19</sup> TTR<sup>7</sup> as well as for gelsolin<sup>10</sup> that sulfated GAGs are incorporated into the core of the fibrils, supporting a scaffold-based mechanism of GAGs-accelerated IAPP amyloidogenesis.

By CD spectroscopy we observed a random coil to  $\alpha$ -helix conformational transition upon binding of IAPP to heparin in both pH studied and at a 1:10 molar ratio. After 16 h incubation, this helical conformation is shifted to a  $\beta$ -sheet rich secondary structure, a conformation associated to the cross  $\beta$ -sheet quaternary structure of the amyloids. However, we cannot postulate if this  $\alpha$ -helical intermediate is on or off-pathway to amyloid fibril formation, an important issue in the mechanistic studies of the amyloidogenesis of natively unfolded polypeptides.<sup>32</sup> When proIAPP<sub>1-48</sub> is mixed with heparan sulfate, a partially helical intermediate is observed.<sup>20</sup> Recently, a mechanism for IAPP self-assembly that includes the formation of helical intermediates followed by an  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet conformational rearrangement has been inferred by CD, FTIR, and NMR.<sup>33</sup> Moreover, a recent deep review of the available literature suggests that IAPP could populate an early on-pathway helical intermediate.<sup>25</sup> However, in our study, we could not observe this helical intermediate when IAPP was incubated with heparin at a 1:40 molar ratio (heparin:IAPP); a  $\beta$ -sheet spectra was rather observed at time 0, pH 7.4. The point is whether this helical intermediate was not transiently present in these conditions or our experimental procedures (dead time of 10 s and 10 s/reading at each 0.5 nm wavelength) did not permit its detection. It is reasonable to postulate, according to the binding stoichiometry inferred from ITC, that at a molar ratio of 1:40, the local density of the amyloidogenic sequence of IAPP at the surface of heparin is rapidly sufficiently high to drive the amyloidogenic process and thus, the helical intermediates cannot be observed. Our data, supported by the literature, suggest a model where the positively charged N-terminal domain of IAPP binds to the negatively charged sulfated groups of IAPP, favoring the formation of a putative  $\alpha$ -helix

spanning approximately from residues 8–18 or 8–22. Then, the high local concentration of peptides on GAG scaffold as well as the helical transient conformation drive the self-association of the amyloidogenic domain(s) of IAPP, such as the 22–27 segment, *en route* to the formation of  $\beta$ -sheet-rich assemblies.

In the present study, the thermodynamics of IAPP-heparin interaction was studied by ITC and our data indicate that the enthalpy-driven binding is sensitive to the protonation state of residue His<sup>18</sup>. Besides, no significant heats of binding were observed in presence of a physiologically relevant ionic strength (150 mM NaCl). Although no binding could be monitored by ITC, heparin has a potent stimulating effect on IAPP fibrillogenesis at 150 mM NaCl, as observed by the quasi-absence of lag phase in the kinetics aggregation assay. Similarly, heparan sulfate is competent to stimulate the aggregation of the nonamyloidogenic IAPP variant, I26P-IAPP, in presence of a very high salt concentrations (500 mM NaCl).<sup>16</sup> These results are very interesting as they indicate that although the binding affinity and energetics of IAPP to sulfated GAGs might be lowered under physiological conditions, GAGs can still have a potent effect on the kinetics of amyloid fibril formation, supporting the postulate that GAGs are actively involved in the amyloidogenic process *in vivo*.

IAPP is thought to accelerate the pathogenesis of DM-2 by exacerbating the loss of pancreatic  $\beta$ -cells that cosecrete insulin and IAPP. When IAPP, either mostly monomeric or partially aggregated, is applied to the cell media of INS-1 cells, a concentration-dependant decrease of cell viability is observed. When heparin (1  $\mu$ M and higher) is either coapplied to cells (Fresh) or preincubated with 50  $\mu$ M IAPP, the IAPP-induced cytotoxicity is significantly reduced. Moreover, ThT kinetics aggregation assay exposed that below a 1:50 molar ratio, heparin has little effect on IAPP amyloidogenesis. Taken together, these results suggest that heparin-enhanced IAPP fibrillogenesis stimulates the formation of nontoxic amyloid fibrils. In this view, it has been proposed over the last decade that the oligomeric species of amyloidogenic polypeptides are the most proteotoxic species of the amyloidogenic cascade.<sup>34–36</sup> By strongly reducing the lag phase and by hastening the growth phase, sulfated GAGs would play a protective role in IAPP-related amyloidosis by facilitating the quaternary structural conversion of prefibrillar toxic oligomers into less proteotoxic amyloid fibrils. The protecting role of GAGs against the toxicity of amyloidogenic polypeptides has been reported for A $\beta$ ,<sup>37</sup> the aortic amyloid medin peptide,<sup>38</sup> the N-terminal domain of HypH,<sup>39</sup> and the apomyoglobin protein.<sup>40</sup> However, our results are partially inconsistent with the recent study of Jha et al.,<sup>19</sup> which shows that high molecular weight heparin was poorly protecting  $\beta$ -cells against IAPP toxicity, in contrast to short heparin derivatives (dp2 and dp8).

It has been demonstrated that the presence of heparan sulfate at the outer face of the plasma membrane mediates the toxicity of the A $\beta$  peptide,<sup>41</sup> an avenue that has never been explored so far in the case of IAPP. Herein, we investigated the influence of cell surface GAGs in IAPP-mediated cytotoxicity. Our results show a similar concentration-dependant cytotoxic effect of IAPP on wild-type CHO cells as compared to GAGs-deficient CHO cells pgsA-745.<sup>28</sup> Similar results were obtained for INS-1 cells treated with GAGs lyases. Our findings are not in line with the study performed on heparan sulfate deficient cell line, CHO pgsD-677,<sup>41</sup> treated with A $\beta$  peptide. On the other hand, the Chiti group has recently shown that the lack of GAGs cell surface does not prevent HypF-N aggregates toxicity,<sup>39</sup> suggesting heterogeneity among the mechanisms of cellular toxicity of amyloidogenic polypeptides. Taken together, our study reinforces the thesis that sulfated GAGs are actively implicated in IAPP amyloidogenesis *in vivo*, where they mostly play a protective role interacting with cytotoxic quaternary species and converting them into less culprit amyloids.

## MATERIALS AND METHODS

Fmoc-protected amino acids, Rink-amide AM resin and coupling reagents for solid phase peptide synthesis were purchased from Matrix Innovation. Pseudoproline (oxazolidine) dipeptide derivatives were obtained from Novabiochem. Acetonitrile (ACN), *N,N*-dimethylformamide (DMF), diethylether, and dichloromethane (DCM) were from Fisher Scientific. All other chemicals, reagents and enzymes were from Sigma-Aldrich.

### IAPP Synthesis, Purification, and Cyclization

IAPP was synthesized by solid phase peptide synthesis based on Fmoc chemistry and 2-(6-Chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate (HCTU) coupling strategy. Briefly, all amino acids (3–10 equiv.) were coupled using an *in situ* activation with HCTU and diisopropylethylamine (DIEA) in DMF for 30 min. Each coupling was monitored using the ninhydrin test and coupling was repeated until completion. Fmoc-protecting group was removed with 20% piperidine/DMF. According to the strategy developed by Abedini and Raleigh,<sup>42</sup> two oxazolidine pseudoproline dipeptide derivatives were incorporated: Fmoc-Ser-Ser( $\psi^{Me,Me}$ pro)-OH was incorporated at positions Ser-19 and Ser-20 whereas Fmoc-Leu-Ser( $\psi^{Me,Me}$ pro)-OH was inserted at positions Leu-27 and Ser-28. Cleavage from the resin was achieved with a mixture of TEA/ethanedithiol/phenol/water (92/2.5/3/2.5) and after TFA evaporation, the peptide was precipitated with diethylether, washed several times with diethylether, solubilized in 20% acetic acid (v/v) before being lyophilized.

Crude IAPP was initially purified by preparative reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a linear gradient of ACN in H<sub>2</sub>O/TEA (0.06% v/v) at a flow rate of 20 ml/min. To increase the solubility, crude IAPP was dissolved in 35% acetic acid (v/v) before being injected on a C18 (5  $\mu$ m, 100 Å) column (250  $\times$  21.2 mm<sup>2</sup>). Collected fractions were analyzed by analytical

RP-HPLC using a C18 (3.6  $\mu$ m) column (250  $\times$  4.6 mm<sup>2</sup>) and a linear gradient of ACN in H<sub>2</sub>O/TEA (0.06% v/v) at a flow rate of 1 ml/min. Fractions were also analyzed by "time of flight" mass spectrometry using a LC/MS-TOF (Agilent) to confirm the identity of the peptide. Fractions corresponding to the desired peptide were pooled and lyophilized before cyclization was performed.

Disulfide bond formation between Cys-2 and Cys-7 was achieved by dimethyl sulfoxide (DMSO) oxidation according to the method developed by Abedini et al.<sup>43</sup> Briefly, partially purified IAPP was dissolved in 100% DMSO at a final concentration of 2 mg/ml and the sample was gently stirred for 20 h at room temperature. After incubation, 50% acetic acid (v/v) was added to the peptide mixture to a final ratio of 9:1 (50% acetic acid:DMSO) and IAPP was repurified by RP-HPLC as above described. Fractions corresponding to the desired product, as revealed by MS-TOF analysis, and with purity higher than 95%, confirmed by analytical RP-HPLC, were finally pooled and lyophilized. The formation of the intramolecular disulfide was confirmed by treating, or not, IAPP with a mixture of dithiothreitol and  $\beta$ -mercaptoethanol and by comparative analyses of the treated and nontreated samples with analytical RP-HPLC.

### Aggregation Kinetics Measured by Thioflavin T Fluorescence

Aliquots of IAPP were prepared by dissolving the lyophilized peptide in 100% hexafluoro-2-propanol (HFIP) to a concentration of 1 mg/ml. The solution was sonicated for 30 min and filtered through a 0.22  $\mu$ m hydrophilic polypropylene filter before being lyophilized. Lyophilized IAPP was resolubilized in HFIP at 1 mg/ml, sonicated for 30 min and the solution was aliquoted and lyophilized to remove HFIP. Samples were kept dried at -80°C until used. IAPP solutions were prepared by dissolving the lyophilized (and prefiltered) IAPP at a concentration of 50  $\mu$ M (2 $\times$ ) in either 20 mM Tris, pH 7.4, or 20 mM MES, pH 5.5, both solutions containing 40  $\mu$ M ThT immediately before final dilution and measurement. GAGs solution were prepared as 100 $\times$  stock solutions in the corresponding buffers. Assays were performed at 25°C without stirring in sealed black-wall, clear-bottom 96-well nonbinding surface plates (Corning) with a total volume of 100  $\mu$ l per well. ThT fluorescence was measured every 10 min over the course of 20 h, using an Infinite M200 fluorescence plate reader (TECAN). The fluorescence, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm, was measured from the bottom of the well. For each experiment, control reactions (without IAPP) were carried. Data obtained from triplicate wells were averaged, corrected by subtracting the corresponding control reaction, and plotted as fluorescence versus time. Each curve represents the average of at least two independent experiments performed in triplicate.

### Circular Dichroism Spectroscopy

Lyophilized aliquots of IAPP (prepared as above-described) were dissolved in either 20 mM Tris, pH 7.4, or 20 mM MES, pH 5.5, at 2 $\times$  (50  $\mu$ M) and mixed with an equivalent of 2 $\times$  (5  $\mu$ M, 1.35  $\mu$ M, or 0  $\mu$ M) of heparin prepared in the corresponding buffer, and the sample was incorporated into a 2 mm path length quartz cell. Far-UV CD spectra were recorded from 189 to 260 nm using a J-815 CD spectropolarimeter (Jasco) at 25°C. The wavelength step was set at 0.5 nm with an average time of 10 s per scan at each wavelength step. Each collected spectrum was background subtracted with the



corresponding IAPP-free sample. Each spectrum represents the average of at least two independent experiments.

### Isothermal Titration Calorimetry

Measurements were performed using a Microcal VP-ITC (GE Healthcare). Lyophilized aliquots of IAPP (prepared as above-described) were dissolved in either Tris buffer (20 mM, pH 7.4) or MES (20 mM, pH 5.5) with or without 150 mM NaCl at a final concentration of 50  $\mu$ M just before being injected into the calorimeter cell. Heparin was prepared at a final concentration of 15  $\mu$ M in either Tris buffer (20 mM, pH 7.4) or MES (20 mM, pH 5.5) with or without 150 mM NaCl. Titrations were performed by injecting 10  $\mu$ l of the 15  $\mu$ M heparin solution (except for the initial 2  $\mu$ l injection) into IAPP solution. The temperature was set at 25°C. Heats of dilution were measured by injecting heparin solution into the corresponding buffer and were included in the final analysis. Data analysis was done with the software package (Origin) provided by manufacturer. Data were fit to an independent set of multiple binding sites model.

### Cell Toxicity Assay

Rat INS-1 ( $\beta$ -pancreatic cell line) cells were seeded in black wall clear bottom 96-well plates (TC treated) at a density of 35,000 cells/well (100  $\mu$ l/well) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol. After 24 h incubation at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator, cells were treated by directly adding 50  $\mu$ l of IAPP solutions at 3 $\times$  in 20 mM Tris, pH 7.4, (with or without GAGs) that have been preincubated, or not, for 24 h at room temperature. The cells were incubated another 24 h and cell viability was measured by the resazurin reduction assay. Cell viability (in %) was calculated from the ratio of the fluorescence of the treated sample to the control cells (nontreated). Wild-type CHO and GAGs deficient CHO pgsA-745 cells were seeded in clear bottom 96-well plates (TC treated) at a density of 7,500 cells/well (100  $\mu$ l/well) in F12 medium supplemented with 5% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and the assay was performed as described earlier. For digestion of cell-surface GAGs, INS-1 cells were seeded as above described. After 24 h incubation, the cell media was removed and replaced with serum-free RPMI-1640 medium containing 1 U/ml of heparinase I and 0.5 U/ml of chondroitinase ABC. After 24 h incubation, media was replaced with fresh RPMI-1640 (serum free, 1 U/ml of heparinase I, and 0.5 U/ml of chondroitinase ABC) and IAPP treatment and viability assay were performed as described earlier.

### REFERENCES

- Chiti, F.; Dobson, C. M. *Ann Rev Biochem* 2006, 75, 333–366.
- Kelly, J. W. *Curr Opin Struct Biol* 1998, 8, 101–106.
- Ancsin, J. B. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 2003, 10, 67–79.
- Magnus, J. H.; Stenstad, T.; Kolset, S. O.; Husby, G. *Scand J Immunol* 1991, 34, 63–69.
- DeWitt, D. A.; Silver, J.; Canning, D. R.; Perry, G. *Exp Neurol* 1993, 121, 149–152.
- Young, I. D.; Ailles, L.; Narindrasorasak, S.; Tan, R.; Kisilevsky, R. *Arch Pathol Lab Med* 1992, 116, 951–954.
- Bourgault, S.; Solomon, J. P.; Reibach, N.; Kelly, J. W. *Biochemistry* 2011, 50, 1001–1015.
- Relini, A.; De Stefano, S.; Torrassa, S.; Cavalleri, O.; Rolandi, R.; Gliozzi, A.; Giorgetti, S.; Raimondi, S.; Marchese, L.; Verga, L.; Rossi, A.; Stoppini, M.; Bellotti, V. *J Biol Chem* 2008, 283, 4912–4920.
- McLaurin, J.; Franklin, T.; Zhang, X.; Deng, J.; Fraser, P. E. *Eur J Biochem/FEBS* 1999, 266, 1101–1110.
- Solomon, J. P.; Bourgault, S.; Powers, E. T.; Kelly, J. W. *Biochemistry* 2011, 50, 2486–2498.
- Castillo, G. M.; Cummings, J. A.; Yang, W.; Judge, M. E.; Sheardown, M. J.; Rimvall, K.; Hansen, J. B.; Snow, A. D. *Diabetes* 1998, 47, 612–620.
- Motamedi-Shad, N.; Monsellier, E.; Torrassa, S.; Relini, A.; Chiti, F. *J Biol Chem* 2009, 284, 29921–29934.
- Motamedi-Shad, N.; Garfagnini, T.; Penco, A.; Relini, A.; Fogolari, F.; Corazza, A.; Esposito, G.; Bemporad, F.; Chiti, F. *Nat Struct Mol Biol* 2012, 19, 547–554, S541–S542.
- Suk, J. Y.; Zhang, F.; Balch, W. E.; Linhardt, R. J.; Kelly, J. W. *Biochemistry* 2006, 45, 2234–2242.
- Westermarck, P.; Andersson, A.; Westermarck, G. T. *Physiol Rev* 2011, 91, 795–826.
- Gotz, J.; Ittner, L. M.; Lim, Y. A. *Cell Mol Life Sci: CMLS* 2009, 66, 1321–1325.
- Yan, L. M.; Tatarek-Nossol, M.; Velkova, A.; Kazantzis, A.; Kapurmiotu, A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 2046–2051.
- Wang, H.; Cao, P.; Raleigh, D. P. *J Mol Biol* 2013, 425, 492–505.
- Jha, S.; Patil, S. M.; Gibson, J.; Nelson, C. E.; Alder, N. N.; Alexandrescu, A. T. *J Biol Chem* 2011, 286, 22894–22904.
- Meng, F.; Abedini, A.; Song, B.; Raleigh, D. P. *Biochemistry* 2007, 46, 12091–12099.
- Abedini, A.; Tracz, S. M.; Cho, J. H.; Raleigh, D. P. *Biochemistry* 2006, 45, 9228–9237.
- Marek, P. J.; Patsalo, V.; Green, D. F.; Raleigh, D. P. *Biochemistry* 2012, 51, 8478–8490.
- Meng, F.; Abedini, A.; Plesner, A.; Verchere, C. B.; Raleigh, D. P. *Biochemistry* 2010, 49, 8127–8133.
- Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. *Anal Biochem* 1989, 177, 244–249.
- Meng, F.; Abedini, A.; Plesner, A.; Middleton, C. T.; Potter, K. J.; Zanni, M. T.; Verchere, C. B.; Raleigh, D. P. *J Mol Biol* 2010, 400, 555–566.
- Abedini, A.; Raleigh, D. P. *Prot Eng Des Sel: PEDS* 2009, 22, 453–459.
- Bradshaw, A. C.; Parker, A. L.; Duffy, M. R.; Coughlan, L.; van Rooijen, N.; Kalaria, V. M.; Nicklin, S. A.; Baker, A. H. *PLoS Pathogens* 2010, 6, e1001142.
- Esiko, J. D.; Stewart, T. E.; Taylor, W. H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, 82, 3197–3201.
- Watson, D. J.; Lander, A. D.; Selkoe, D. J. *J Biol Chem* 1997, 272, 31617–31624.
- Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J.; McFarlane, H. T.; Madsen, A. O.; Riekel, C.; Eisenberg, D. *Nature* 2007, 447, 453–457.
- Luca, S.; Yau, W. M.; Leapman, R.; Tycko, R. *Biochemistry* 2007, 46, 13505–13522.
- Abedini, A.; Raleigh, D. P. *Phys Biol* 2009, 6, 015005.

33. Liu, G.; Prabhakar, A.; Aucoin, D.; Simon, M.; Sparks, S.; Robbins, K. J.; Sheen, A.; Petty, S. A.; Lazo, N. D. *J Am Chem Soc* 2010, 132, 18223–18232.
34. Kaye, R.; Head, E.; Thompson, J. L.; McIntire, T. M.; Milton, S. C.; Cotman, C. W.; Glabe, C. G. *Science* 2003, 300, 486–489.
35. Bemporad, F.; Chiti, F. *Chem Biol* 2012, 19, 315–327.
36. Bourgault, S.; Choi, S.; Buxbaum, J. N.; Kelly, J. W.; Price, J. L.; Reixach, N. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 410, 707–713.
37. Bergamaschini, L.; Donarini, C.; Rossi, E.; De Luigi, A.; Vergani, C.; De Simoni, M. G. *Neurobiol Aging* 2002, 23, 531–536.
38. Madine, J.; Middleton, D. A. *Eur Biophys J: EBJ* 2010, 39, 1281–1288.
39. Saridakis, T.; Zampagni, M.; Mannini, B.; Evangelisti, E.; Taddei, N.; Cecchi, C.; Chiti, F. *J Mol Biol* 2012, 421, 616–630.
40. Vilasi, S.; Sarcina, R.; Maritato, R.; De Simone, A.; Irace, G.; Sirangelo, I. *PLoS one* 2011, 6, e22076.
41. Sandwall, E.; O'Callaghan, P.; Zhang, X.; Lindahl, U.; Lannfelt, L.; Li, J. P. *Glycobiology* 2010, 20, 533–541.
42. Abedini, A.; Raleigh, D. P. *Org Lett* 2005, 7, 693–696.
43. Abedini, A.; Singh, G.; Raleigh, D. P. *Anal Biochem* 2006, 351, 181–186.

## ANNEXE B

ARTICLE III : SYNTHESIS OF 2,5-DIARYL-SUBSTITUTED THIOPHENES AS  
HELICAL MIMETICS: TOWARDS THE MODULATION OF ISLET AMYLOID  
POLYPEPTIDE (IAPP) AMYLOID FIBRIL FORMATION AND CYTOTOXICITY

## Peptidomimetics

# Synthesis of 2,5-Diaryl-Substituted Thiophenes as Helical Mimetics: Towards the Modulation of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Amyloid Fibril Formation and Cytotoxicity

Avid Hassanpour,<sup>[a]</sup> Carole Anne De Carufel,<sup>[b]</sup> Steve Bourgault,<sup>\*,[b]</sup> and Pat Forgiione<sup>\*,[a]</sup>

**Abstract:** A range of 2,5-diarylated thiophenes were synthesised as small molecule mimetics of the  $\alpha$ -helix to modulate the amyloidogenesis and cytotoxic effect of islet amyloid polypeptide (IAPP). 3-Substituted thiophene-2-carboxylic acids were used as key intermediates and functionalised by palladium decarboxylative cross-coupling and direct C–H ac-

tivation successively with overall yields ranging from 23 to 95%. The effect of the ligands on IAPP amyloid fibril formation was evaluated with the thioflavin T (ThT) fluorescence-based assay. Furthermore, the capacity of these compounds to inhibit the cytotoxic effect of IAPP was assessed using  $\beta$ -pancreatic cells.

## Introduction

The aberrant assembly of polypeptides into insoluble protein aggregates, including amyloid fibrils, is the hallmark of several diseases, such as Alzheimer's, type II diabetes (DM-2) and systemic amyloidosis.<sup>[1]</sup> These protein misfolding/aggregation disorders differ by the identity of the protein that misassembles and by the tissue subjected to protein deposition and cellular degeneration.<sup>[2]</sup> For instance, in patients afflicted by DM-2, the islet amyloid polypeptide (IAPP) deposits in the pancreas, leading to the degeneration of the islets of Langerhans.<sup>[3]</sup> IAPP is a 37-amino acid C-terminally  $\alpha$ -amidated peptide that is co-secreted with insulin by pancreatic  $\beta$ -cells. IAPP is an unusual aggregation-prone peptidic hormone that readily forms amyloid fibrils.<sup>[3]</sup> The IAPP amyloidogenic process observed in the pancreas is believed to accelerate DM-2 pathogenesis by exacerbating  $\beta$ -cell degeneration and ultimately compromising insulin secretion.<sup>[3]</sup> When applied to isolated pancreatic  $\beta$ -cells in culture, IAPP is cytotoxic by mechanisms that are still not clearly understood.<sup>[4]</sup> Over the last two decades, several compounds have been reported to inhibit IAPP aggregation in vitro by interfering with the later stages of fibrillogenesis, that is, through the destabilisation of the ordered cross  $\beta$ -sheet quaternary structure of the amyloid fibrils.<sup>[5a,b]</sup> However, this mechanism does not prevent the formation of prefibrillar oligomers that

were recently recognised as the most cytotoxic proteospecies of the amyloidogenic cascade,<sup>[6]</sup> suggesting a potential drawback to this approach.

IAPP exhibits a conformational ensemble mainly populated by disordered conformations in its non-aggregated soluble state, although it diverges from an absolute random coil by the presence of local and transient ordered structure.<sup>[7]</sup> Recent mechanistic studies have suggested that this pro-amyloidogenic peptide undergoes a random coil to  $\alpha$ -helix conformational conversion during the initial phase of self-assembly and that the helical intermediates could be on-pathway to amyloid formation.<sup>[7,8]</sup> According to this model,  $\alpha$ -helix formation and self-association of helical segments are linked and accelerate self-assembly,<sup>[9]</sup> with similar driving forces to those of coiled coil motif formation. Consequently, this accelerated self-assembly generates a high local concentration of the amyloidogenic domain of IAPP (segment 20–29), which has a high propensity to adopt a  $\beta$ -structure, favouring the formation of cross- $\beta$ -sheet assemblies and en route to amyloid formation. Consistently, IAPP was shown to adopt a helical structure spanning approximately residues 8 to 19 when the peptide was bound to model membranes<sup>[10]</sup> or glycosaminoglycans (GAGs),<sup>[14]</sup> and these interactions accelerate the rate of IAPP amyloid fibril formation.

According to the helical intermediates hypothesis described above, an alternative strategy to control the formation of IAPP amyloid fibrils would be to design molecules that target and stabilise the transient helical segment 8–19 of IAPP, modulating the helix-assembly process. This approach could inhibit the formation of oligomeric and fibrillar aggregates by over-stabilising the helical intermediates, not allowing the propagation of the  $\beta$ -sheet conformation from the 20–29 domain of IAPP. Recent studies using membrane models have shown that, indeed, IAPP can be trapped in a non-amyloid prone helical conformation.<sup>[15,16]</sup> Alternatively, as reported for lipids and GAGs, helical targeting ligands could potentially accelerate the

[a] A. Hassanpour, Prof. P. Forgiione  
Concordia University  
Department of Chemistry and Biochemistry, Phormagom  
7141 rue Sherbrooke O., Montréal, QC H4B 1R6 (Canada)  
E-mail: pat.forgiione@concordia.ca

[b] C. A. De Carufel, Prof. S. Bourgault  
Pharmagom, Department of Chemistry  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succursale Centre-Ville Montréal, QC H3C 3P8 (Canada)  
E-mail: bourgault.steve@uqam.ca

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201303928>.

self-assembly of IAPP into  $\beta$ -sheet-rich amyloid fibrils by initially shifting the conformational equilibrium towards the  $\alpha$ -helix, without overly stabilising the helical motif. Considering that oligomers are the most potent cytotoxic proteospecies,<sup>[6d]</sup> both pathways will decrease the toxicity induced by the amyloidogenic process of IAPP, either by blocking the formation of pre-fibrillar assemblies ( $\alpha$ -helix over-stabilisation) or by accelerating the structural conversion of oligomers into less cytotoxic amyloid fibrils.

Miranker and Hamilton groups recently developed small molecules targeting the transient helical state of IAPP in order to inhibit lipid-catalysed aggregation.<sup>[11]</sup> These polycarboxylate ligands were developed on pyridyl, quinoline or peptoid scaffolds and were shown to inhibit lipid-induced IAPP aggregation, but to strongly accelerate IAPP fibrillogenesis in lipid-free conditions. Alternatively, other synthetic templates have been shown to be attractive scaffolds towards interacting/stabilising the  $\alpha$ -helical region of proteins.<sup>[12]</sup> Functionalised terphenyls<sup>[13]</sup> (compound 1) represent one such scaffold with a reported application as a mimic of the  $\alpha$ -helix side chain of smooth muscle myosin light chain kinase (smMLCK) to disrupt its interaction with calmodulin (CaM; Figure 1 a).<sup>[14]</sup>

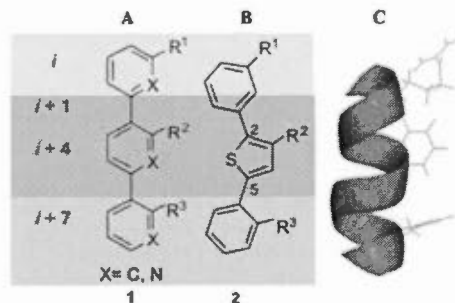


Figure 1. A) 3,2',2''-Trisubstituted terphenyl template (compound 1), B) 2,5-diaryl substituted thiophene template (compound 2), C) ribbon representation of IAPP  $\alpha$ -helix (PDB ID: 2KB8).<sup>[22]</sup>

Binding of ligands to the helical motif largely results from the interaction of the ligand with the amino acid side chains projecting on one face of the  $\alpha$ -helix and spaced three or four residues away from each other, referred to as  $i$ ,  $i+4$  and  $i+7$  (Figure 1). In the transient helical conformation of IAPP comprising residues 8–19, residues Arg11, Phe15 and His18 are oriented on one face of the  $\alpha$ -helix<sup>[20a]</sup> and represent the key motif that will be targeted to stabilise the transient  $\alpha$ -helix of IAPP (Figure 1c). As hypothesised from coiled coil motifs formation, the presence of hydrophilic side chains (Arg, His) will provide the specificity of interaction whereas the hydrophobic residue Phe will contribute to the thermodynamic stability of the interaction by hydrophobic core packing.

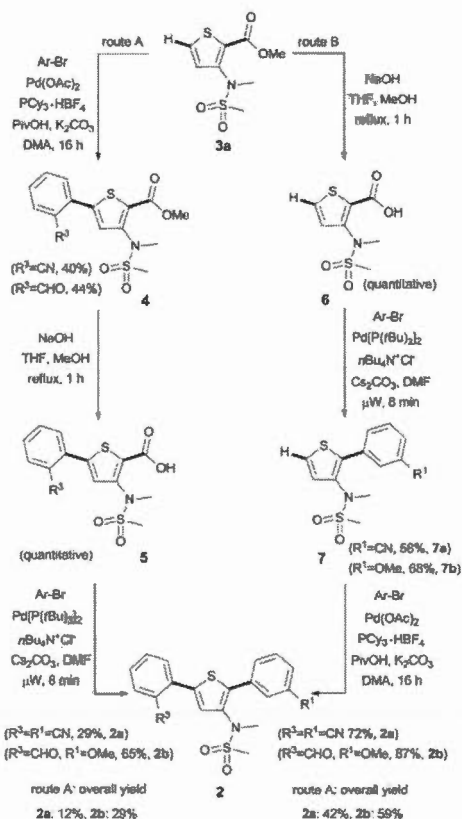
Relying on the bioisosterism of thiophene and benzene,<sup>[15]</sup> we have designed a library of compounds related to the terphenyl scaffold. The replacement of benzene with thiophene

allows for several significant synthetic advantages. The presence of the heteroatom in thiophene introduces changes in reactivity that allows convenient chemo- and regioselective pathways that are unavailable in the synthesis of terphenyl compounds. Specifically, a five-membered heteroaromatic core scaffold (Figure 1b, compound 2) affords a flexible synthetic approach in which substituent modifications can be made in a modular manner while avoiding the long synthetic routes that have been used previously for the synthesis of terphenyls.<sup>[14]</sup>

The synthesis of diaryl substituted heteroaromatics has been previously accomplished through various palladium catalysed cross-coupling reactions. The predominant strategies involve the utilisation of organometallic precursors and/or result in the formation of symmetrically substituted heteroaromatics.<sup>[15b,16]</sup> For example, palladium catalysed C–H activation reactions have emerged as attractive methods for the formation of carbon–carbon bonds between heteroarenes and aryl halides without the use of organometallic derivatives.<sup>[17]</sup> However, the main limitation of C–H functionalisation of 3-substituted thiophenes is the formation of mixed arylated products at the C2 and C5 positions.<sup>[18]</sup> To avoid this limitation yet still take advantage of a C–H arylation strategy while controlling the regioselectivity of the products, commercially available 3-substituted thiophene 2-carboxylic acids have been used in combination with decarboxylative cross-coupling. Decarboxylative cross-coupling reactions have been developed as a powerful method for the formation of carbon–carbon bonds between aliphatic and aromatic carboxylic acids and aryl or vinyl substrates.<sup>[19]</sup> Decarboxylative arylation processes circumvent the requirement of organometallic building blocks<sup>[20]</sup> offering readily available, inexpensive and easy to use coupling partners. In this view, we performed palladium catalysed decarboxylative cross-coupling reaction of thiophene carboxylic acids and various aryl bromides.<sup>[19b,21]</sup> The combination of both the C–H arylation and decarboxylative cross-coupling reactions allows for a short, modular pathway through which a large library of  $\alpha$ -helix mimetic compounds can be readily synthesised. In the current work, the molecules produced by this approach were tested as modulators of the formation of IAPP fibrils as a proof-of-concept. However, the general synthetic route can be used for the preparation of molecules tailored with different side-chain residues to stabilise and/or interact with the  $\alpha$ -helix of other proteins for various applications.<sup>[22]</sup>

## Results and Discussion

Two pathways have been envisaged for the preparation of 2,5-diarylated thiophenes (2), differing only in the order of the two different coupling reactions (Scheme 1). As illustrated in Scheme 1, route A utilises C5-arylation of the substituted thiophene methyl ester 3a resulting in aryl-thiophene intermediate 4 followed by saponification to provide carboxylic acid 5. Decarboxylative cross-coupling of acid 5 results in the formation of the desired 2,5-diaryl substituted thiophene 2. Alternatively, initial saponification of ester 3a in pathway B provides the thiophene carboxylic acid intermediate 6 that can undergo de-



Scheme 1. Comparison of the two synthetic pathways.

carboxylative cross-coupling to afford aryl-thiophene 7. This is followed by C5-arylation to provide the desired 2,5-diaryl substituted thiophene 2.

Initially, in order to compare the efficiency of each pathway, both routes were carried out using the same substituted aryl bromides (2- and 3-bromobenzonitrile). Interestingly, both the C5-arylation and decarboxylative cross-coupling steps in route A resulted in lower yields compared to route B, giving overall yields of 2,5-diaryl substituted thiophene 2a of 12 and 42% (R<sup>1</sup>=CN, R<sup>2</sup>=CN), respectively. In order to examine whether the superior efficiency of route B was general, other functionalised aryl halides were also employed in both pathways. Scheme 1 shows one other example using 2-bromobenzaldehyde and 3-bromoanisole in which, once again, a higher overall yield was observed with route B compared to route A (59 vs. 29%, respectively, R<sup>1</sup>=OMe, R<sup>2</sup>=CHO). Route B was therefore chosen for the preparation of the remaining analogues.

The required thiophene carboxylic acids underwent decarboxylative cross-coupling with a variety of aryl bromides to produce the corresponding arylated thiophenes (Table 1).<sup>[18d]</sup> The protocol efficiently transforms 3-substituted thiophene carboxylic acid derivatives to a range of 2-aryl-substituted heteroaromatics in moderate to good yields (Table 1). We examined electron-poor and -rich aryl bromides and the results illustrate that both types of substituents are well tolerated in the reaction.

Table 1. Synthesis of monoaryl substituted thiophenes.

Entry	R <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	Product	Yield <sup>[a]</sup> [%]
1	N-MeMs	CN	7a	58
2	N-MeMs	OMe	7b	68
3	N-MeMs	CO <sub>2</sub> Et	7c	66
4	Me	CN	7d	69
5	Me	OMe	7e	75
6	Me	CO <sub>2</sub> Et	7f	61

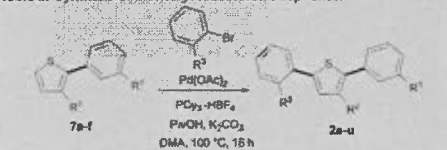
[a] Isolated yields. Condition: thiophene carboxylic acid (2 equiv), aryl bromide (1 equiv), Pd(P(tBu)<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0.05 equiv), nBu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> (1 equiv), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 equiv), anhydrous DMF, 8 min microwave irradiation at 170 °C.

Fagnou and co-workers have developed C–H activation reaction conditions utilising a wide range of heteroaromatics and aryl bromides.<sup>[17a]</sup> The products from the decarboxylative cross-coupling reaction were subjected to these C–H activation conditions to effect a regioselective C–H activation at the C5 position of the 2-arylthiophene to generate 2,5-diaryl substituted thiophenes. A range of aryl bromides were utilised and moderate to excellent yields were obtained (Table 2). Moreover, the electron density of the existing substituent aryl group on the thiophene did not affect the yields.

All compounds were initially investigated for their capacity of modulating IAPP amyloid fibril formation by means of the thioflavin T (ThT) fluorescence assay. ThT is a dye that fluoresces upon its binding to protein aggregates with a cross-β-sheet structure, mostly fibrillar in morphology.<sup>[23]</sup> IAPP amyloidogenesis is a nucleation-dependent polymerisation process that is characterised by a ThT-negative phase (lag-phase; around 6 h), in which the high-energy nucleus is formed, followed by a thermodynamically favourable elongation phase that is characterised by the rapid growth of ThT-positive fibrils (Figure 2A). According to the helical intermediates described above, the random coil→α-helix conformational conversion occurred during the initial stage of the lag phase. Analysis of the aggregation kinetics obtained by ThT fluorescence gave us early mechanistic insights about the effects of these substituted thiophenes on IAPP amyloidogenic pathway.

Among all compounds prepared in the course of this study, compound 21 (Table 2, entry 16) slowed the formation of ThT-positive aggregates, as observed by the increase of the lag-

Table 2. Synthesis of monoaryl substituted thiophenes.



Entry	R <sup>3</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	Product	Yield <sup>[a]</sup> [%]
7	CN	Me	OMe	2c	23
8	CHO	Me	OMe	2d	79
9	CF <sub>3</sub>	Me	OMe	2e	81
10	CO <sub>2</sub> Et	Me	OMe	2f	73
11	CO <sub>2</sub> Et	Me	CO <sub>2</sub> Et	2g	94
12	CN	Me	CO <sub>2</sub> Et	2h	81
13	CF <sub>3</sub>	Me	CO <sub>2</sub> Et	2i	72
14	CHO	Me	CO <sub>2</sub> Et	2j	65
15	CF <sub>3</sub>	Me	CN	2k	47
16	CN	Me	CN	2l	50
17	H	Me	CN	2m	69
18	CHO	<i>N</i> -MeMs	OMe	2b	87
19	CN	<i>N</i> -MeMs	OMe	2n	75
20	CF <sub>3</sub>	<i>N</i> -MeMs	OMe	2o	78
21	CO <sub>2</sub> Et	<i>N</i> -MeMs	CN	2p	77
22	CHO	<i>N</i> -MeMs	CN	2q	64
23	CF <sub>3</sub>	<i>N</i> -MeMs	CN	2r	95
24	CN	<i>N</i> -MeMs	CN	2a	72
25	CHO	<i>N</i> -MeMs	CO <sub>2</sub> Et	2s	65
26	CF <sub>3</sub>	<i>N</i> -MeMs	CO <sub>2</sub> Et	2t	75
27	CN	<i>N</i> -MeMs	CO <sub>2</sub> Et	2u	93

[a] Isolated yields. Condition: heterocyclic thiophene (1 equiv), aryl halide (2 equiv), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 equiv), PCy<sub>3</sub>-HBF<sub>4</sub> (0.1 equiv), PivOH (0.3 equiv), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 equiv), anhydrous DMF, 16 h thermal heating at 100 °C.

phase period (Figure 2A) when the compound was used at an equimolar ratio. Moreover, compound 2l showed concentration-dependence inhibition of the formation of IAPP ThT-positive aggregates, with a lag phase of 15 h at 8 molar equivalents (100  $\mu$ M; Figure 2B).

At 50 and 100  $\mu$ M (4 and 8 equivalents, respectively) compound 2l also decreased the final ThT fluorescence, suggesting that a lower amount of IAPP amyloid fibrils were formed and/or that these aggregates showed a less defined cross- $\beta$ -sheets quaternary structure. We also varied the concentration of ThT fluorescent dye to confirm that this inhibitory effect was not the result of a displacement of ThT binding to fibrillar aggregates by compound 2l. Our results showed that in the presence of 10, 40 or 100  $\mu$ M ThT, the increase of the lag-phase period observed with 12.5  $\mu$ M of compound 2l was very similar (data not shown), strongly suggesting that this molecule was, indeed, slowing down the amyloidogenic process. The mechanism by which this 2,5-diaryl substituted thiophene decelerates and partially inhibits IAPP amyloid formation is currently under investigation based on these interesting preliminary results. In contrast, most of the other molecules prepared had little or no effect on the kinetics of IAPP amyloid formation, as represented by compound 2d (Figure 2A; see the Supporting Information for additional results). Nonetheless, several of these compounds (compounds 2l, 2j, 2n, 2o, 2p and 2t)

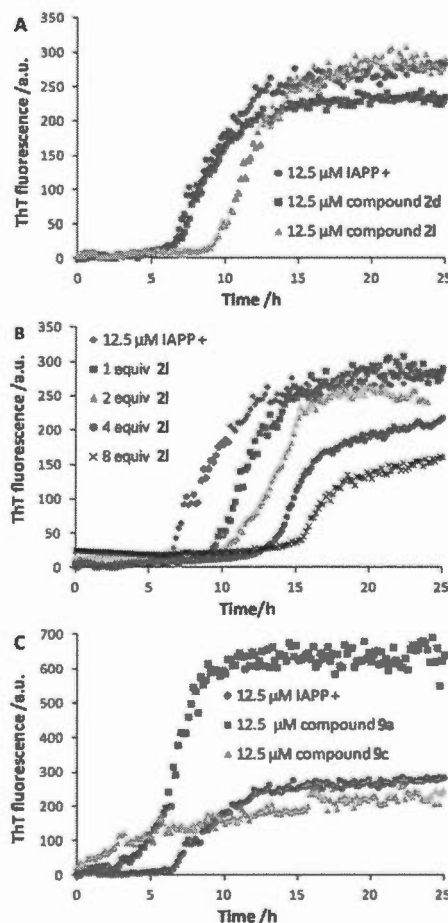


Figure 2. Effects of 2,5-diaryl substituted thiophenes on IAPP kinetics of amyloid fibril formation monitored by ThT fluorescence. IAPP (12.5  $\mu$ M) was incubated in 20 mM Tris, pH 7.4, at 25 °C without agitation in the absence (A, B and C;  $\bullet$ ) or in the presence of 12.5  $\mu$ M of compound 2d (A;  $\blacksquare$ ), 12.5  $\mu$ M compound 2l (A;  $\blacktriangle$ ), increasing molar equivalent of compound 2l (B), 12.5  $\mu$ M of compound 9a (C;  $\blacksquare$ ) or 12.5  $\mu$ M compound 9c (C;  $\blacktriangle$ ). ThT fluorescence (40  $\mu$ M) was measured every 10 min over the course of 25 h, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.

increased the final ThT fluorescence without affecting the lag phase or the rate of amyloid fibrils formation (see the Supporting Information).

IAPP is a positively charged peptide that displays three positive charges at physiological pH, thus favouring electrostatic interactions with negatively charged molecules. Particularly, we designed several mono- and diacid aryl substituted thiophenes to target one side of the transient IAPP helix that exhibits a hy-

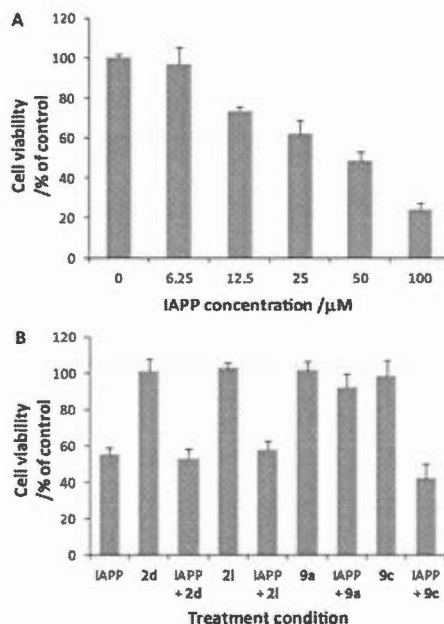
**Table 3.** Mono- and diacid aryl substituted thiophenes.

Entry	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Product
28	CN	Me	<b>9b</b>
29	CF <sub>3</sub>	Me	<b>9c</b>
30	CHO	Me	<b>9d</b>
31	CF <sub>3</sub>	<i>N</i> -MeMs	<b>9e</b>

drophobic region (Phe15) surrounded by polar and/or charged residues (Arg11 and His18; Table 3).

As suspected, acid(s)-functionalised thiophenes showed profound effects on IAPP amyloidogenesis at a 1:1 molar ratio. Interestingly, monoacid substituted thiophenes with a methyl group at position R<sup>2</sup> (compounds **9b**, **9c** and **9d**) virtually abolished the lag phase without significantly affecting the final ThT fluorescence. This aggregation kinetic suggests that these compounds induce the formation of IAPP aggregates with lower ThT-binding capacities, indicative of non-fibrillar structure (Figure 2C). In sharp contrast, the diacid analogue (compound **9a**) reduced the lag phase and led to a significant increase of the final ThT fluorescence (Figure 2C). This suggests that a larger amount of amyloids was formed in the presence of 1 equivalent of compound **9a** and/or that these amyloid fibrils exhibit a better-defined cross- $\beta$ -sheet quaternary structure. These possibilities are currently under investigation. To probe if the accelerating effects of the mono- and diacid aryl substituted thiophenes on IAPP amyloidogenesis are simply a result of non-specific charge neutralisation effects, we used benzoic acid as a control compound. The amyloids formation kinetic data obtained in the presence of 12.5  $\mu$ M (1 equivalent) and 125  $\mu$ M (10 equivalent) of benzoic acid are very similar to the control (see the Supporting Information). Together, these data indicate that the negative charge(s) on the thiophene scaffold are crucial for the modulating activity and that the nature and/or the position of other substituents also play a key role, suggesting specific interactions. We are currently investigating the mechanisms by which these derivatives modulate the formation of amyloid fibrils.

Subsequently we analysed the cytotoxicity of IAPP species that has been pre-incubated for 20 h in the absence or presence of selected 2,5-diarylthiophene derivatives. We and others have previously reported that IAPP induces death of pancreatic cells when the amyloidogenic peptide is directly added to the cell culture medium.<sup>[4,24]</sup> In fact, IAPP pre-incubated for 20 h without compounds decreased pancreatic  $\beta$ -cells viability in a concentration-dependant manner (Figure 3A). When IAPP was pre-incubated with 1 molar equivalent of either compound **2d**, **2l** or **9c**, no changes in the proteotoxic effects induced by 50  $\mu$ M IAPP were observed (Figure 3B). However, pre-incubation of IAPP with the diacid substituted thiophene (compound **9a**) before cell treatment totally abolished the cytotoxic effects of IAPP. This result suggests that



**Figure 3.** Effects of 2,5-diaryl substituted thiophenes on IAPP-induced toxicity on pancreatic  $\beta$ -cells. A) INS-1 cells were treated with concentrations of IAPP ranging from 0 to 100  $\mu$ M for 24 h and cell viability was measured by the resazurin reduction assay and compared to cells treated with vehicle only (100% cell viability). B) INS-1 cells were treated with 50  $\mu$ M IAPP that had been pre-incubated for 20 h in 20 mM Tris, pH 7.4, 25 °C, in the absence or presence of one molar equivalent of the thiophene derivatives. After 24 h incubation, cell viability was measured.

this compound stimulates the formation of poorly toxic IAPP quaternary species, mostly fibrillar, according to the high ThT fluorescence observed (Figure 3B). It is noteworthy that all tested compounds were not toxic on  $\beta$ -pancreatic cells when used at a concentration of 50  $\mu$ M. In this study, the cytotoxicity assays were performed with IAPP that has been pre-incubated for 20 h without or with compounds, since we wanted to initially evaluate the cytotoxicity of the species (quaternary and/or monomeric) that are present when the ThT fluorescence plateau is reached. We are currently assessing the cytotoxicity of intermediates that are generated during the different amyloidogenic phases (lag, growth and plateau) in the presence of these thiophene derivatives. Although these results are preliminary and biophysical investigations are in progress to delineate the mechanisms by which these molecules interfere with IAPP amyloidogenic process, this study demonstrates that we can modulate not only the kinetics of amyloid fibril formation of an amyloidogenic peptide, but also its cytotoxicity with small molecules that were designed to mimic/target the transient helical motif.



## Conclusion

A modular approach has been developed for the synthesis of highly functionalised 2,5-diaryl substituted thiophene scaffolds utilising palladium mediated cross-coupling reactions. The strategy allows us to quickly construct ligands in an efficient manner for screening towards the interaction with and stabilisation of  $\alpha$ -helices. In this effort, the ligands were assessed for their capacity to modulate IAPP amyloidogenesis and cytotoxicity on  $\beta$ -pancreatic cells. The preliminary results demonstrated that some of the molecules could act as modulators of IAPP amyloidogenesis by increasing or decreasing the lag-phase period of IAPP amyloid fibril formation. Investigations are in progress to better understand the mechanism by which these molecules interact with IAPP. As several amyloidogenic natively disordered (poly)peptides, including the amyloid- $\beta$  peptide, calcitonin and  $\alpha$ -synuclein, populate helical intermediates during the initial phase of fibril formation, these 2,5-diaryl substituted thiophenes could ultimately lead to the development of novel therapeutics for protein amyloid-related diseases.

## Experimental Section

### Procedure for decarboxylative cross-coupling

The procedure employed by Forgione and co-workers was used with slight modifications.<sup>[10a]</sup> In a 2–5 mL, open to air, oven dried microwave vial were added the heterocyclic carboxylic acid (2 equiv), aryl bromide (1 equiv), tetra-*n*-butylammonium chloride (1 equiv), cesium carbonate (1.5 equiv), bis(tri-*tert*-butylphosphine)-palladium(0) (0.05 equiv) and anhydrous DMF (0.1 M of the aryl bromide solution). The vial was capped with a septum and the mixture was pre-stirred for 30 s at 23 °C and submitted to microwave heating at 170 °C for 8 min with stirring and the high absorption setting. The crude mixture was cooled to 23 °C and was filtered over Celite®. The solution was then diluted with EtOAc and the organic layer was washed with a saturated NaCl aqueous solution (3×), saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (2×), water (1×), and saturated NaCl aqueous solution (1×). The aqueous phases were combined and extracted with EtOAc. The combined organic phases were dried over sodium sulfate, and after filtration the solvent was evaporated to provide the crude compound.

### Procedure for C–H activation

A procedure employed by Fagnou and co-workers was used with slight modifications.<sup>[17a]</sup> An oven-dried vial equipped with a magnetic stir bar was charged with heterocycle (1 equiv), aryl bromide (2 equiv), PCy<sub>3</sub>·HBF<sub>4</sub> (0.1 equiv), PivOH (0.3 equiv), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 equiv), and palladium(II) acetate (0.05 equiv). Anhydrous DMA (0.08 M of the heterocycle solution) was added. Liquid aryl bromides were added after the addition of solvent. The mixture was heated for 16 h at 100 °C. After being cooled to 23 °C, the reaction mixture was diluted with EtOAc and filtered through a pad of Celite. The filtrate was washed with a saturated NaCl aqueous solution (3×), saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (2×; unless otherwise stated), water (1×), and saturated NaCl aqueous solution (1×). The aqueous phases were combined and extracted with EtOAc. The combined organic phases were dried over sodium sulfate, and after filtration the solvent was evaporated to provide the crude compound.

## Acknowledgements

We would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and Le Fonds de Recherche du Québec, Nature et Technologies (FQRNT) and Pharmagam for financial support. C.A.D.C. is a recipient of a studentship from the Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines (GRASP). Support was also kindly provided by Boehringer Ingelheim, Merck Frosst, Wyeth, and Concordia University. We thank Dr. Simon Woo for reading this manuscript and helpful suggestions. We also thank Dr. Alexey Denisov and Jean-Pierre Falgoutyret for useful discussions and access to equipment.

**Keywords:** amyloids • decarboxylative arylation • C–H arylation • peptidomimetics • thiophenes

- [1] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366.
- [2] a) J. W. Kelly, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 5; b) J. W. K. Fred, E. Cohen, *Nature* **2003**, *426*, 5.
- [3] P. Westermark, A. Andersson, G. T. Westermark, *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 795–826.
- [4] a) C. A. De Carufel, P. T. Nguyen, S. Sahnouni, S. Bourgault, *Biopolymers* **2013**, *100*, 645–655; b) L.-M. Yan, M. Totarek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis, A. Kapurilottu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2046–2051.
- [5] a) R. Mishra, B. Bulic, D. Sellin, S. Jha, H. Waldmann, R. Winter, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4757–4760; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4679–4682; b) P. Cao, D. P. Raleigh, *Biochemistry* **2012**, *51*, 2670–2683.
- [6] a) R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, *Science* **2003**, *300*, 486–489; b) S. Bourgault, S. Choi, J. N. Budbaum, J. W. Kelly, J. L. Price, N. Reixach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *410*, 707–713; c) D. J. Selkoe, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1060–1065; d) F. Bemporad, F. Chiti, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 315–327.
- [7] A. Abedini, D. P. Raleigh, *Phys. Biol.* **2009**, *6*, 015005.
- [8] A. Abedini, D. P. Raleigh, *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, *22*, 453–459.
- [9] a) J. D. Knight, J. A. Hebda, A. D. Miranker, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9496–9508; b) M. Apostolidou, S. A. Jayasinghe, R. Langen, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17205–17210; c) A. D. M. J. A. Williamson, *Pept. Sci.* **2007**, *16*, 7.
- [10] S. A. Jayasinghe, R. Langen, *Biochemistry* **2005**, *44*, 12113–12119.
- [11] a) I. Saragol, J. A. Hebda, J. Becenik, L. A. Estroff, A. D. Miranker, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 748–751; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 736–739; b) S. Kumar, A. D. Miranker, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4749–4751.
- [12] a) T. Berg, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2566–2586; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2462–2481; b) H. Yin, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4200–4235; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4130–4163; c) A. Volonterio, L. Molson, J. Rebek, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3733–3736.
- [13] a) H. Yin, G.-I. Lee, H. S. Park, G. A. Payne, J. M. Rodriguez, S. M. Sebiti, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2764–2767; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2704–2707; b) H. Yin, G.-I. Lee, K. A. Sedey, O. Kutzki, H. S. Park, B. P. Ormer, J. T. Ernst, H.-G. Wang, S. M. Sebiti, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10191–10196; c) O. Kutzki, H. S. Park, J. T. Ernst, B. P. Ormer, H. Yin, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11838–11839.
- [14] B. P. Ormer, J. T. Ernst, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5382–5383.
- [15] a) L. M. Lima, E. J. Barreiro, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23–49; b) E. Bey, S. Marchais-Oberwinkler, M. Negri, P. Kruchten, A. Oster, T. Klein, A. Spadaro, R. Werth, M. Frotscher, B. Birk, R. W. Hartmann, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6724–6743.
- [16] a) P. Amaladas, J. A. Clement, A. K. Mohanakrishnan, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10363–10371; b) J. J. Apperloo, L. B. Groenendaal, H. Verheyen, M. Jayakannan, R. A. J. Janssen, A. Dikhali, D. Beljonne, R. Lazzaroni, J.-L. Brédas, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2384–2396; c) M. Takahashi, K. Masui, H. Sekiguchi, N. Kobayashi, A. Mori, M. Funahashi, N. Tamaki, *J. Am.*

- Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10930–10933; d) A. Dondoni, M. Fogagnolo, A. Medici, E. Negrini, *Synthesis* **1987**, 185–186; e) A. Oster, S. Hinsberger, R. Werth, S. Marchais-Oberwinkler, M. Frotscher, R. W. Hartmann, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8176–8186.
- [17] a) T. Wesch, A. Berthelot-Bréhier, F. R. Leroux, F. Colobert, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2490–2493; b) K. Beydoun, J. Bobel, V. Guerschals, H. Doucet, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1242–1248; c) H. Y. Fu, L. Chen, H. Doucet, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4473–4478; d) N. Della Ca', G. Maestri, M. Catellani, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7850–7853; e) R. Goldhirsh, T. L. Jacques, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3042–3048; f) N. Masuda, S. Tanba, A. Sugie, D. Monguchi, N. Koumura, K. Hara, A. Mori, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2297–2300; g) Y. Bouazziz, K. Beydoun, A. Romdhane, H. B. Jannet, H. Doucet, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 6801–6805; h) X. Chen, K. M. Engle, D.-H. Wang, J.-Q. Yu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5196–5217; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5094–5115; i) S. Preciado, L. Mendive-Tapia, F. Albericio, R. Lavilla, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8129–8135; j) J.-H. Chu, C.-C. Wu, D.-H. Chang, Y.-M. Lee, M.-J. Wu, *Organometallics* **2013**, *32*, 272–282; k) T.-S. Mei, L. Kou, S. Ma, K. M. Engle, J.-Q. Yu, *Synthesis* **2012**, 44, 13; l) J. Peng, L. Liu, Z. Hu, J. Huang, Q. Zhu, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3772–3774; m) F. Deridj, A. L. Gottumukkal, S. Djebbar, H. Doucet, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 2550–2559; n) A. L. Gottumukkal, H. Doucet, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 3629–3632; o) A. L. Chiong, O. Daugulis, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1449–1451; p) L.-C. Campeau, D. J. Schipper, K. Fagnou, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3266–3267; q) B. L. Liégault, D. Lapointe, L. Caron, A. Vlassova, K. Fagnou, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1826–1834; r) B. Liégault, I. Petrov, S. I. Gorelsky, K. Fagnou, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1047–1060; s) D. Stuart, K. Fagnou, in *Inventing Reactions*, Vol. 44 (Ed.: L. J. Gooßen), Springer, Heidelberg, **2013**, pp. 91–119; t) S. I. Gorelsky, D. Lapointe, K. Fagnou, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 658–668; u) D. J. Schipper, K. Fagnou, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 1594–1600; v) H. Y. Fu, H. Doucet, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 7163–7173.
- [18] a) C. B. Bheeter, J. K. Bera, H. Doucet, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 7197–7206; b) P. Forgiione, M.-C. Brochu, M. St-Onge, K. H. Thesen, M. D. Bailey, F. Bilodeau, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11350–11351.
- [19] a) M. Yamashita, K. Hirano, T. Satoh, M. Miura, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 592–595; b) N. Marion, S. P. Nolan, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1440–1449; c) R. Martin, S. L. Buchwald, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1461–1473; d) J. Hassan, M. Sévignon, C. Gozzi, E. Schütz, M. Lemaire, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1359–1470; e) F. Deridj, J. Roger, S. Djebbar, H. Doucet, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4320–4323; f) F. Jafarpour, S. Zarei, M. B. A. Olla, N. Jalalimaneh, S. Rahiminejad, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2957–2964; g) B. Song, T. Knauber, L. J. Gooßen, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 3026–3030; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2954–2958; h) M. Kim, J. Park, S. Sharma, A. Kim, E. Park, J. H. Kwak, Y. H. Jung, I. S. Kim, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 925–927; i) P. Hu, Y. Shang, W. Su, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6047–6051; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5945–5949; j) S. Messaoudi, J.-D. Brion, M. Alami, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1496–1499; k) R. Shang, Z. Huang, L. Chu, Y. Fu, L. Liu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4240–4243; l) D. Pan, C. Zhang, S. Ding, N. Jiao, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4751–4755.
- [20] a) J.-P. Corbet, G. Mignani, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2651–2710; b) J. Miao, H. Ge, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2930–2933; c) X. Li, F. Yang, Y. Wu, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4543–4550; d) N. Gigant, L. Chausset-Boissarie, I. Gilliez, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 816–819; e) M. Kissane, O. A. McNamara, D. Mitchell, D. M. Coppert, H. A. Moynihan, K. T. Lorenz, A. R. Maguire, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 403–405; f) F. Collet, B. Song, F. Rudolphi, L. J. Gooßen, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6486–6501; g) D. Mitchell, D. M. Coppert, H. A. Moynihan, K. T. Lorenz, M. Kissane, O. A. McNamara, A. R. Maguire, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 981–985; h) C. K. Haley, C. D. Gilmore, B. M. Stoltz, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5732–5736.
- [21] F. Bilodeau, M.-C. Brochu, N. Guimond, K. H. Thesen, P. Forgiione, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1550–1560.
- [22] A. B. Mahon, S. E. Miller, S. T. Joy, P. S. Arora, in *Protein-Protein Interactions*, Vol. 8, Springer, Heidelberg, **2012**, pp. 197–230.
- [23] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda, *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 244–249.
- [24] S. Jha, S. M. Patil, J. Gibson, C. E. Nelson, N. N. Alder, A. T. Alexandrescu, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 22894–22904.
- [25] S. M. Patil, S. Xu, S. R. Sheftic, A. T. Alexandrescu, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 11982–11991.

Received: October 7, 2013

Published online on February 2, 2014

# **CHEMISTRY**

---

## **A EUROPEAN JOURNAL**

### Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2014

#### **Synthesis of 2,5-Diaryl Substituted Thiophenes as Helical Mimetics: Towards the Modulation of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Amyloid Fibril Formation and Cytotoxicity**

Avid Hassanpour,<sup>[a]</sup> Carole Anne De Carufel,<sup>[b]</sup> Steve Bourgault,<sup>\*(b)</sup> and Pat Forgione<sup>\*(a)</sup>

chem\_201303928\_sm\_miscellaneous\_information.pdf

## Materials and Methods

### IAPP synthesis, purification and characterization

IAPP was synthesised by solid phase peptide synthesis on a Rink amide polystyrene resin based on Fmoc chemistry and 2-(6-chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate (HCTU) coupling as previously described.<sup>[5]</sup> Cleavage from the resin was achieved with a mixture of TFA/ethanedithiol/phenol/water (92/2.5/3/2.5). Crude IAPP was purified by preparative scale reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a linear gradient of ACN in H<sub>2</sub>O/TFA (0.06% v/v). Collected fractions were analyzed by analytical RP-HPLC using a C18 (3.6  $\mu$ m) column (250 mm x 4.6 mm) and a linear gradient of ACN in H<sub>2</sub>O/TFA (0.06% v/v). Fractions were also analysed by LC/MS-TOF to confirm the identity of the peptide. Disulfide bond formation between Cys-2 and Cys-7 was achieved by dimethyl sulfoxide (DMSO) oxidation according to the method developed by Abedini.<sup>[6]</sup> IAPP was re-purified by RP-HPLC as described above. Fractions corresponding to the desired product, as revealed by MS-TOF analysis, and with purity higher than 95%, confirmed by analytical RP-HPLC, were finally pooled and lyophilized.

### Amyloid formation measured by thioflavin T fluorescence

Aliquots of monomerized IAPP were prepared by dissolving the lyophilized peptide in 100% hexafluoro-2-propanol (HFIP), and the solution was sonicated for 30 minutes and filtered through a 0.22  $\mu$ m hydrophilic polypropylene filter before lyophilisation. Lyophilized IAPP was resolubilized in HFIP, sonicated for 30 minutes and the solution was aliquoted and lyophilized again to remove HFIP. Samples were kept dried at -80 °C until used. IAPP solutions were prepared by dissolving IAPP at a concentration of 25  $\mu$ M (2x of final concentration) in 20 mM Tris, pH 7, 4, 40  $\mu$ M ThT, immediately before final dilution and measurement. Substituted thiophene solutions were prepared at 100x (1.25 mM; final concentration of 12.5  $\mu$ M, unless otherwise specified) in DMSO before being incorporated in the assay mixture. Assays were performed at room temperature (RT) without stirring in sealed black-wall, clear-bottom 96-well non-binding surface plates

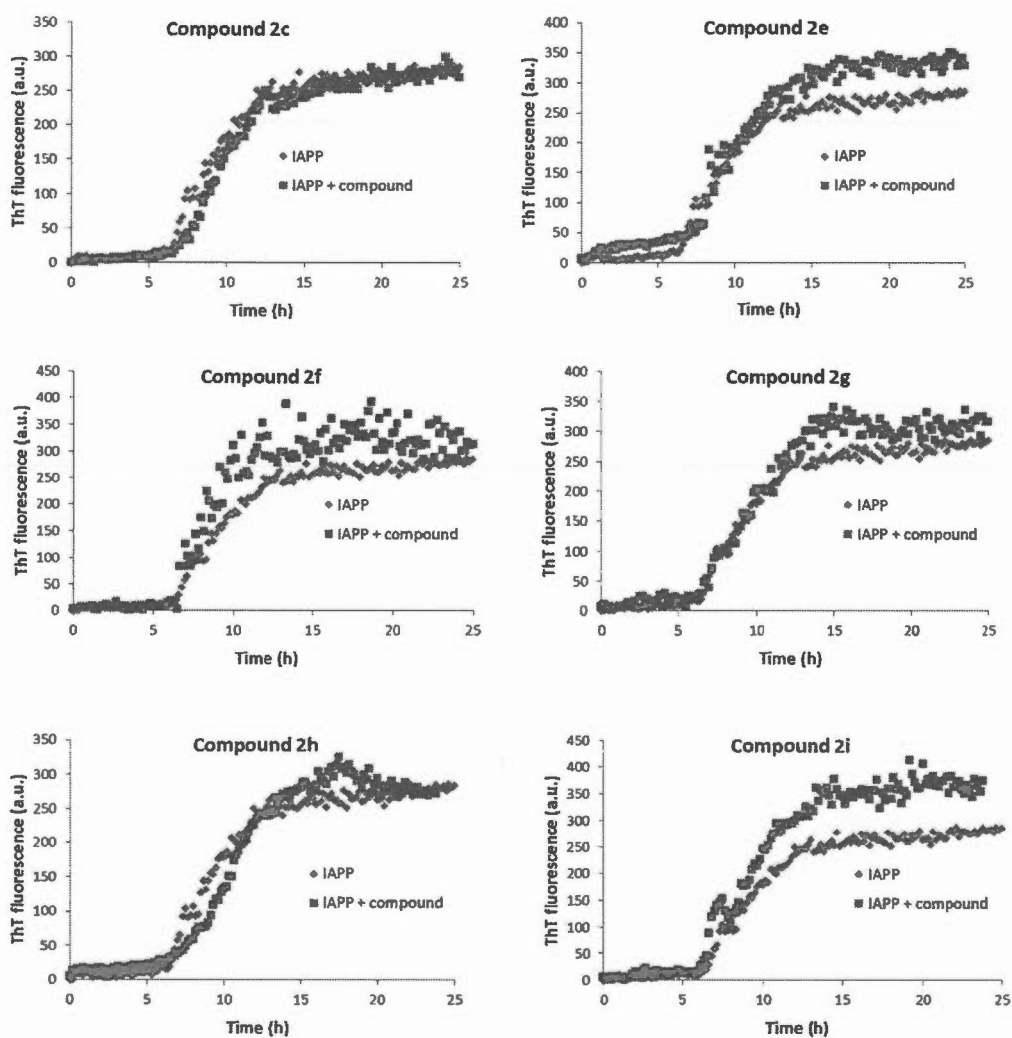
with a volume of 100  $\mu$ L per well. ThT fluorescence was measured from the bottom of the well every 10 min over the course of 25 h with excitation at 440 nm and emission at 485 nm. Data obtained from triplicate runs were averaged and corrected by subtracting the corresponding control reaction.

#### **Cell toxicity assay**

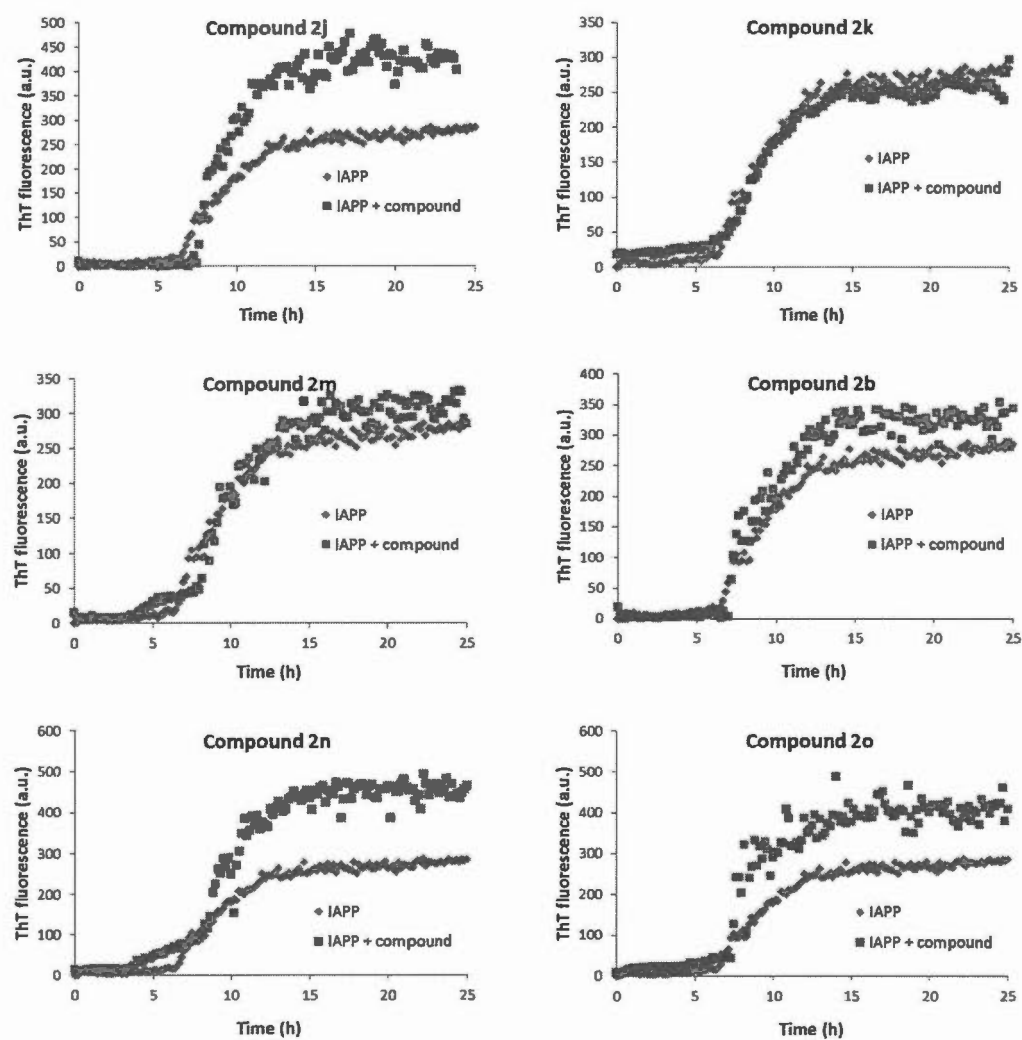
Rat INS-1 ( $\beta$ -pancreatic cell line) cells were seeded in black wall clear bottom 96-well plates at a density of 35 000 cells/well (100  $\mu$ L/well) in RPMI-1640 complete medium.<sup>[5]</sup> After 24 h incubation at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator, cells were treated by directly adding 50  $\mu$ L of IAPP solutions at 3x final concentrations in 20 mM Tris, pH 7,4 that had been pre-incubated for 20 h at room temperature in presence or in absence of 1 equivalent of substituted thiophene derivatives. These solutions were then incubated for an additional 24h, and cell viability was measured by the resazurin reduction assay. Control conditions were performed in presence of 50  $\mu$ M of compounds. Cell viability (in %) was calculated from the ratio of the fluorescence of the treated sample to the control cells (non-treated).

## Figures

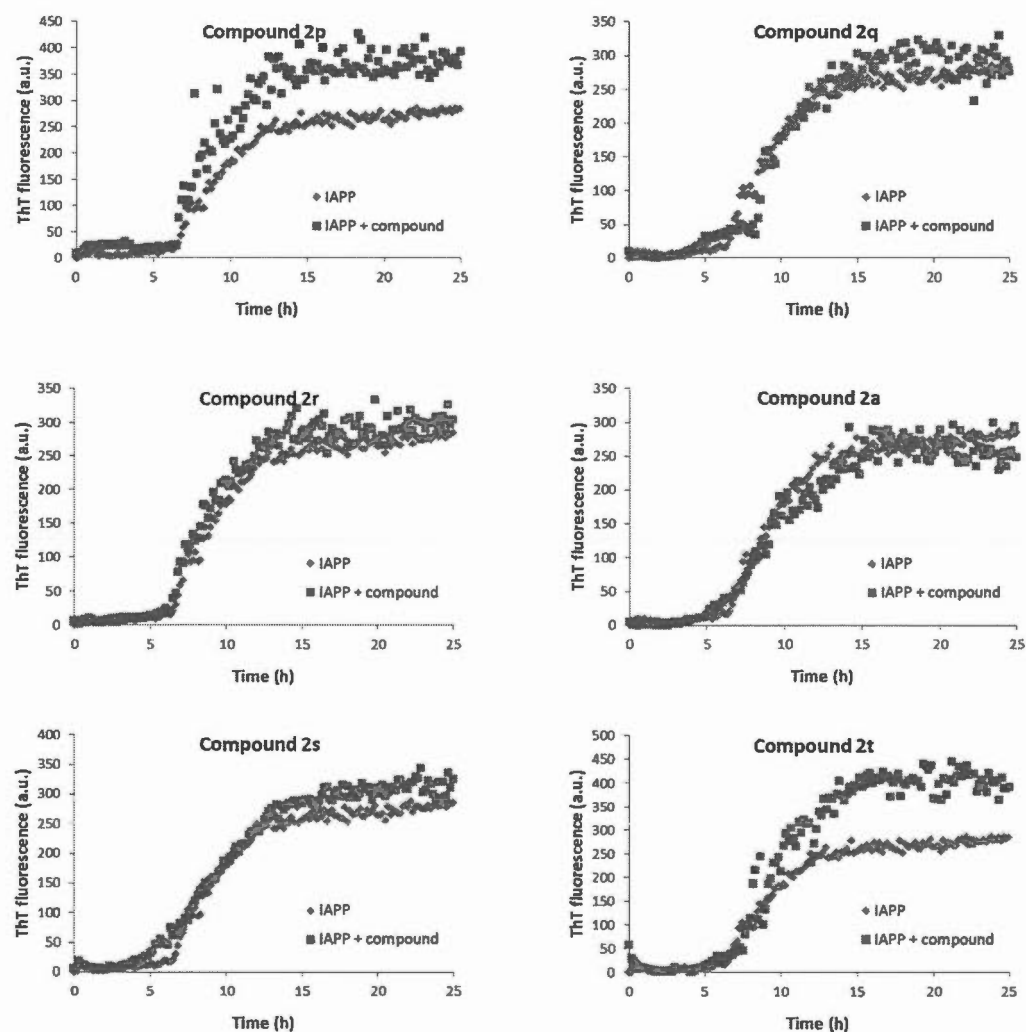
**Figure S.1:** Effects of 2,5-diaryl substituted thiophenes on IAPP kinetics of amyloid fibril formation monitored by ThT fluorescence. IAPP (12.5  $\mu\text{M}$ ) was incubated in 20 mM Tris, pH 7.4, at 25  $^{\circ}\text{C}$  without agitation in the absence ( $\blacklozenge$ , blue) or in the presence of 12.5  $\mu\text{M}$  of compound ( $\blacksquare$ , red). ThT fluorescence (40  $\mu\text{M}$ ) was measured every 10 min over the course of 25 h, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.



**Figure S.2:** Effects of 2,5-diaryl substituted thiophenes on IAPP kinetics of amyloid fibril formation monitored by ThT fluorescence. IAPP (12.5  $\mu$ M) was incubated in 20 mM Tris, pH 7.4, at 25  $^{\circ}$ C without agitation in the absence ( $\blacklozenge$ , blue) or in the presence of 12.5  $\mu$ M of compound ( $\blacksquare$ , red). ThT fluorescence (40  $\mu$ M) was measured every 10 min over the course of 25 h, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.

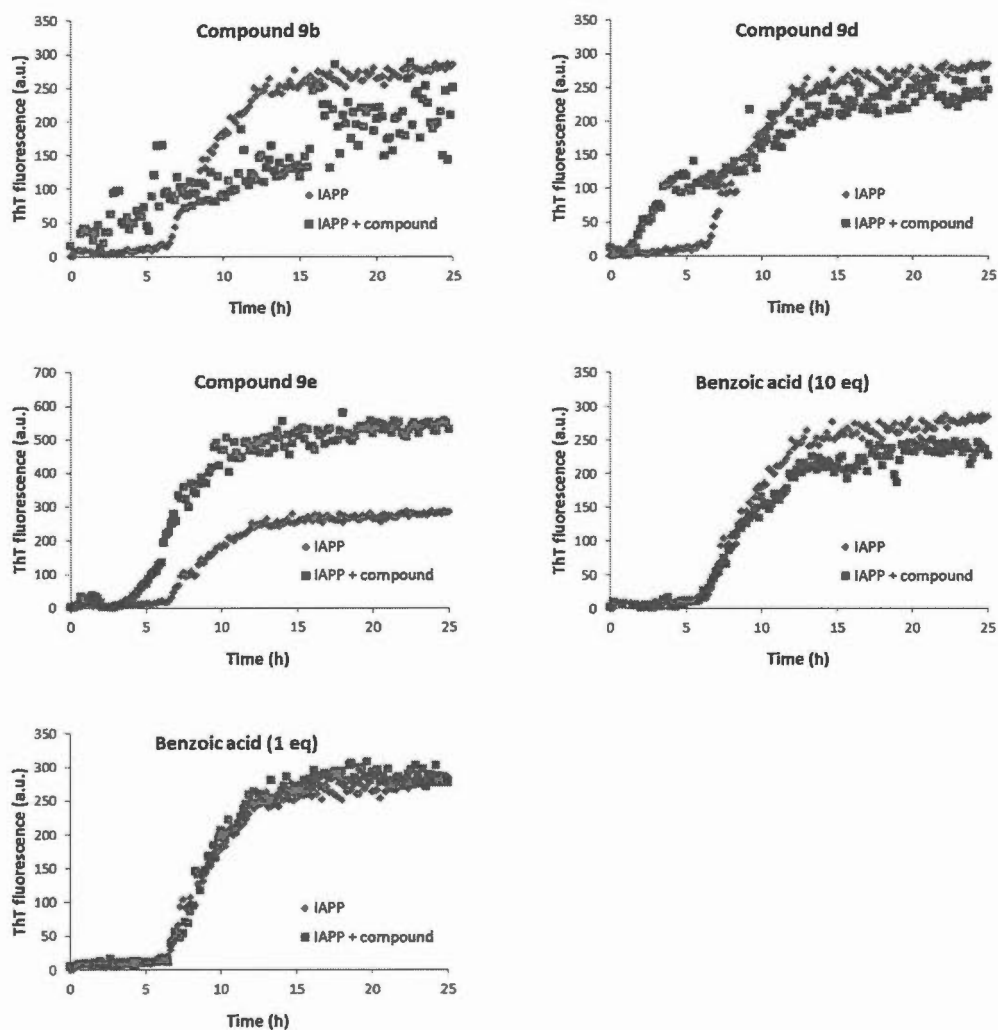


**Figure S.3:** Effects of 2,5-diaryl substituted thiophenes on IAPP kinetics of amyloid fibril formation monitored by ThT fluorescence. IAPP (12.5  $\mu$ M) was incubated in 20 mM Tris, pH 7.4, at 25  $^{\circ}$ C without agitation in the absence ( $\blacklozenge$ , blue) or in the presence of 12.5  $\mu$ M of compound ( $\blacksquare$ , red). ThT fluorescence (40  $\mu$ M) was measured every 10 min over the course of 25 h, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.





**Figure S.4:** Effects of 2,5-diaryl substituted thiophenes and benzoic acid on IAPP kinetics of amyloid fibril formation monitored by ThT fluorescence. IAPP (12.5  $\mu\text{M}$ ) was incubated in 20 mM Tris, pH 7.4, at 25  $^{\circ}\text{C}$  without agitation in the absence ( $\blacklozenge$ , blue) or in the presence of 12.5  $\mu\text{M}$  of compound ( $\blacksquare$ , red). 12.5  $\mu\text{M}$  (1 equiv) and 125  $\mu\text{M}$  of benzoic acid was used (10 equiv). ThT fluorescence (40  $\mu\text{M}$ ) was measured every 10 min over the course of 25 h, with excitation at 440 nm and emission at 485 nm.



## References

- [1] D. Tondi, F. Morandi, R. Bonnet, M. P. Costi, B. K. Shoichet, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4632-4639.
- [2] F. Cardullo, D. Donati, V. Fusillo, G. Merlo, A. Paio, M. Salaris, A. Solinas, M. Taddei, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 834-840.
- [3] P. Forgione, M.-C. Brochu, M. St-Onge, K. H. Thesen, M. D. Bailey, F. Bilodeau, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 11350-11351.
- [4] B. t. Liégault, D. Lapointe, L. Caron, A. Vlassova, K. Fagnou, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1826-1834.
- [5] C. A. De Carufel, P. T. Nguyen, S. Sahnouni, S. Bourgault, *Biopolymers* **2013**, *100*, 645-655.
- [6] A. Abedini, G. Singh, D. P. Raleigh, *Anal. Biochem.* **2006**, *351*, 181-186.

## BIBLIOGRAPHIE

Abedini A et Raleigh DP. 2005. «Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide». *Org Lett* 7: 693-696.

Abedini A et Raleigh DP. 2005. «The role of His-18 in amyloid formation by human islet amyloid polypeptide». *Biochemistry* 44: 16284-16291.

Abedini A et Raleigh DP. 2009. «A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides». *Protein Eng Des Sel* 22: 453-459.

Abedini A et Raleigh DP. 2010. «Islet Amyloid Polypeptide». In *Protein Misfolding Diseases*. pp 517-541. John Wiley & Sons, Inc.

Abedini A, Singh G et Raleigh DP. 2006. «Recovery and purification of highly aggregation-prone disulfide-containing peptides: application to islet amyloid polypeptide». *Anal Biochem* 351: 181-186.

Ancsin JB. 2003. «Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit». *Amyloid* 10: 67-79.

Anguiano M, Nowak RJ et Lansbury PT, Jr. 2002. «Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes». *Biochemistry* 41: 11338-11343.

Apostolidou M, Jayasinghe SA et Langen R. 2008. «Structure of alpha-helical membrane-bound human islet amyloid polypeptide and its implications for membrane-mediated misfolding». *J Biol Chem* 283: 17205-17210.

Asai J, Nakazato M, Miyazato M, Kangawa K, Matsuo H et Matsukura S. 1990. «Regional distribution and molecular forms of rat islet amyloid polypeptide». *Biochem Biophys Res Commun* 169: 788-795.

Baden EM, Owen BA, Peterson FC, Volkman BF, Ramirez-Alvarado M et Thompson JR. 2008. «Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein». *J Biol Chem* 283: 15853-15860.

Badman MK, Shennan KI, Jermany JL, Docherty K et Clark A. 1996. «Processing of pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) by the prohormone convertase PC2». *FEBS Lett* 378: 227-231.

Bedrood S, Li Y, Isas JM, Hegde BG, Baxa U, Haworth IS et Langen R. 2012. «Fibril structure of human islet amyloid polypeptide». *J Biol Chem* 287: 5235-5241.

Bentley G, Dodson E, Dodson G, Hodgkin D et Mercola D. 1976. «Structure of insulin in 4-zinc insulin». *Nature* 261: 166-168.

Bourgault S, Choi S, Buxbaum JN, Kelly JW, Price JL et Reixach N. 2011. «Mechanisms of transthyretin cardiomyocyte toxicity inhibition by resveratrol analogs». *Biochem Biophys Res Commun* 410: 707-713.

Bourgault S, Solomon JP, Reixach N et Kelly JW. 2011. «Sulfated glycosaminoglycans accelerate transthyretin amyloidogenesis by quaternary structural conversion». *Biochemistry* 50: 1001-1015.

Bram Y, Frydman-Marom A, Yanai I, Gilead S, Shaltiel-Karyo R, Amdursky N et Gazit E. 2014. «Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies». *Sci Rep* 4: 4267.

Brender JR, Hartman K, Nanga RP, Popovych N, de la Salud Bea R, Vivekanandan S, Marsh EN et Ramamoorthy A. 2010. «Role of zinc in human islet amyloid polypeptide aggregation». *J Am Chem Soc* 132: 8973-8983.

Brender JR, Hartman K, Reid KR, Kennedy RT et Ramamoorthy A. 2008. «A single mutation in the nonamyloidogenic region of islet amyloid polypeptide greatly reduces toxicity». *Biochemistry* 47: 12680-12688.

Brender JR, Heyl DL, Samiseti S, Kotler SA, Osborne JM, Pesaru RR et Ramamoorthy A. 2013. «Membrane disordering is not sufficient for membrane permeabilization by islet amyloid polypeptide: studies of IAPP(20-29) fragments». *Phys Chem Chem Phys* 15: 8908-8915.

Brender JR, Lee EL, Cavitt MA, Gafni A, Steel DG et Ramamoorthy A. 2008. «Amyloid fiber formation and membrane disruption are separate processes localized in two distinct regions of IAPP, the type-2-diabetes-related peptide». *J Am Chem Soc* 130: 6424-6429.

Brender JR, Lee EL, Hartman K, Wong PT, Ramamoorthy A, Steel DG et Gafni A. 2011. «Biphasic effects of insulin on islet amyloid polypeptide membrane disruption». *Biophys J* 100: 685-692.

Brender JR, Salamekh S et Ramamoorthy A. 2012. «Membrane disruption and early events in the aggregation of the diabetes related peptide IAPP from a molecular perspective». *Acc Chem Res* 45: 454-462.

Brenner DA, Jain M, Pimentel DR, Wang B, Connors LH, Skinner M, Apstein CS et Liao R. 2004. «Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress». *Circ Res* 94: 1008-1010.

Buchanan LE, Dunkelberger EB, Tran HQ, Cheng PN, Chiu CC, Cao P, Raleigh DP, de Pablo JJ, Nowick JS et Zanni MT. 2013. «Mechanism of IAPP amyloid fibril formation involves an intermediate with a transient beta-sheet». *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 19285-19290.

Butler AE, Jang J, Gurlo T, Carty MD, Soeller WC et Butler PC. 2004. «Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes». *Diabetes* 53: 1509-1516.

Caillon L, Lequin O et Khemtemourian L. 2013. «Evaluation of membrane models and their composition for islet amyloid polypeptide-membrane aggregation». *Biochim Biophys Acta* 1828: 2091-2098.

Campioni S, Monsellier E et Chiti F. 2010. «Why Proteins Misfold». In *Protein Misfolding Diseases*. pp 1-20. John Wiley & Sons, Inc.

Cao P, Abedini A, Wang H, Tu LH, Zhang X, Schmidt AM et Raleigh DP. 2013. «Islet amyloid polypeptide toxicity and membrane interactions». *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 19279-19284.

Cao P, Marek P, Noor H, Patsalo V, Tu LH, Wang H, Abedini A et Raleigh DP. 2013. «Islet amyloid: from fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity». *FEBS Lett* 587: 1106-1118.

Carles J. 1956. «Colorimetric microdetermination of phosphorus». *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 38: 255-257.

Castillo GM, Cummings JA, Yang W, Judge ME, Sheardown MJ, Rimvall K, Hansen JB et Snow AD. 1998. «Sulfate content and specific glycosaminoglycan backbone of perlecan are critical for perlecan's enhancement of islet amyloid polypeptide (amylin) fibril formation». *Diabetes* 47: 612-620.

Charge SB, de Koning EJ et Clark A. 1995. «Effect of pH and insulin on fibrillogenesis of islet amyloid polypeptide in vitro». *Biochemistry* 34: 14588-14593.

Chiti F et Dobson CM. 2006. «Protein misfolding, functional amyloid, and human disease». *Annu Rev Biochem* 75: 333-366.

Christmanson L, Rorsman F, Stenman G, Westermark P et Betsholtz C. 1990. «The human islet amyloid polypeptide (IAPP) gene. Organization, chromosomal localization and functional identification of a promoter region». *FEBS Lett* 267: 160-166.

Christopoulos G, Perry KJ, Morfis M, Tilakaratne N, Gao Y, Fraser NJ, Main MJ, Foord SM et Sexton PM. 1999. «Multiple amylin receptors arise from receptor activity-

modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product». *Mol Pharmacol* 56: 235-242.

Collawn JF et Matalon S. 2014. «CFTR and lung homeostasis». *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307: L917-923.

Cooper GJ, Leighton B, Dimitriadis GD, Parry-Billings M, Kowalchuk JM, Howland K, Rothbard JB, Willis AC et Reid KB. 1988. «Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle». *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7763-7766.

Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB et Reid KB. 1987. «Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients». *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8628-8632.

Cooper ME, McNally PG, Phillips PA et Johnston CI. 1995. «Amylin stimulates plasma renin concentration in humans». *Hypertension* 26: 460-464.

Craig SP, Buckle VJ, Lamouroux A, Mallet J et Craig I. 1986. «Localization of the human tyrosine hydroxylase gene to 11p15: gene duplication and evolution of metabolic pathways». *Cytogenet Cell Genet* 42: 29-32.

De Carufel CA, Nguyen PT, Sahnouni S et Bourgault S. 2013. «New insights into the roles of sulfated glycosaminoglycans in islet amyloid polypeptide amyloidogenesis and cytotoxicity». *Biopolymers* 100: 645-655.

Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I et Glabe CG. 2005. «Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers». *J Biol Chem* 280: 17294-17300.

DeWitt DA, Silver J, Canning DR et Perry G. 1993. «Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease». *Exp Neurol* 121: 149-152.

Dupuis NF, Wu C, Shea JE et Bowers MT. 2009. «Human islet amyloid polypeptide monomers form ordered beta-hairpins: a possible direct amyloidogenic precursor». *J Am Chem Soc* 131: 18283-18292.

Dupuis NF, Wu C, Shea JE et Bowers MT. 2011. «The amyloid formation mechanism in human IAPP: dimers have beta-strand monomer-monomer interfaces». *J Am Chem Soc* 133: 7240-7243.

Eanes ED et Glenner GG. 1968. «X-ray diffraction studies on amyloid filaments». *J Histochem Cytochem* 16: 673-677.

Ehrlich JC et Ratner IM. 1961. «Amyloidosis of the islets of Langerhans. A restudy of islet hyalin in diabetic and non-diabetic individuals». *Am J Pathol* 38: 49-59.

Engel MF, Khemtёмourian L, Kleijer CC, Meeldijk HJ, Jacobs J, Verkleij AJ, de Kruijff B, Killian JA et Hoppener JW. 2008. «Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane». *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6033-6038.

Engel MF, Yigittop H, Elgersma RC, Rijkers DT, Liskamp RM, de Kruijff B, Hoppener JW et Antoinette Killian J. 2006. «Islet amyloid polypeptide inserts into phospholipid monolayers as monomer». *J Mol Biol* 356: 783-789.

Evangelisti E, Cecchi C, Cascella R, Sgromo C, Becatti M, Dobson CM, Chiti F et Stefani M. 2012. «Membrane lipid composition and its physicochemical properties define cell vulnerability to aberrant protein oligomers». *J Cell Sci* 125: 2416-2427.

Fauvet B, Fares MB, Samuel F, Dikiy I, Tandon A, Eliezer D et Lashuel HA. 2012. «Characterization of semisynthetic and naturally Nalpha-acetylated alpha-synuclein in vitro and in intact cells: implications for aggregation and cellular properties of alpha-synuclein». *J Biol Chem* 287: 28243-28262.

Fawthrop DJ, Boobis AR et Davies DS. 1991. «Mechanisms of cell death». *Arch Toxicol* 65: 437-444.



Fox N, Schrementi J, Nishi M, Ohagi S, Chan SJ, Heiserman JA, Westermark GT, Leckstrom A, Westermark P et Steiner DF. 1993. «Human islet amyloid polypeptide transgenic mice as a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM)». *FEBS Lett* 323: 40-44.

Fu Z, Aucoin D, Davis J, Van Nostrand WE et Smith SO. 2015. «Mechanism of Nucleated Conformational Conversion of Abeta42». *Biochemistry* 54: 4197-4207.

Gebre-Medhin S, Mulder H, Pekny M, Westermark G, Tornell J, Westermark P, Sundler F, Ahren B et Betsholtz C. 1998. «Increased insulin secretion and glucose tolerance in mice lacking islet amyloid polypeptide (amylin)». *Biochem Biophys Res Commun* 250: 271-277.

Geddes AJ, Parker KD, Atkins ED et Beighton E. 1968. «"Cross-beta" conformation in proteins». *J Mol Biol* 32: 343-358.

Gedulin B, Cooper GJS et Young AA. 1991. «Amylin secretion from the perfused pancreas: Dissociation from insulin and abnormal elevation in insulin-resistant diabetic rats». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 180: 782-789.

Gilead S, Wolfenson H et Gazit E. 2006. «Molecular mapping of the recognition interface between the islet amyloid polypeptide and insulin». *Angew Chem Int Ed Engl* 45: 6476-6480.

Goldsbury C, Kistler J, Aebi U, Arvinte T et Cooper GJ. 1999. «Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy». *J Mol Biol* 285: 33-39.

Goldsbury CS, Cooper GJ, Goldie KN, Muller SA, Saafi EL, Gruijters WT, Misur MP, Engel A, Aebi U et Kistler J. 1997. «Polymorphic fibrillar assembly of human amylin». *J Struct Biol* 119: 17-27.

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ et Golenbock DT. 2008. «The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta». *Nat Immunol* 9: 857-865.

Hassanpour A, De Carufel CA, Bourgault S et Forgione P. 2014. «Synthesis of 2,5-diaryl-substituted thiophenes as helical mimetics: towards the modulation of islet amyloid polypeptide (IAPP) amyloid fibril formation and cytotoxicity». *Chemistry* 20: 2522-2528.

Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Poyner DR et Sexton PM. 2005. «Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: receptor activity-modifying protein complexes». *Mol Pharmacol* 67: 1655-1665.

Hebda JA et Miranker AD. 2009. «The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes». *Annu Rev Biophys* 38: 125-152.

Hebda JA, Saraogi I, Magzoub M, Hamilton AD et Miranker AD. 2009. «A peptidomimetic approach to targeting pre-amyloidogenic states in type II diabetes». *Chem Biol* 16: 943-950.

Hoppener JW, Oosterwijk C, van Hulst KL, Verbeek JS, Capel PJ, de Koning EJ, Clark A, Jansz HS et Lips CJ. 1994. «Molecular physiology of the islet amyloid polypeptide (IAPP)/amylin gene in man, rat, and transgenic mice». *J Cell Biochem* 55 Suppl: 39-53.

Hoppener JW, Oosterwijk C, Visser-Vernooy HJ, Lips CJ et Jansz HS. 1992. «Characterization of the human islet amyloid polypeptide/amylin gene transcripts: identification of a new polyadenylation site». *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1569-1577.

Hossain P, Kavar B et El Nahas M. 2007. «Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge». *N Engl J Med* 356: 213-215.

Huang CJ, Haataja L, Gurlo T, Butler AE, Wu X, Soeller WC et Butler PC. 2007. «Induction of endoplasmic reticulum stress-induced beta-cell apoptosis and accumulation of polyubiquitinated proteins by human islet amyloid polypeptide». *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1656-1662.

Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Tanzi RE et Bush AI. 2004. «Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's Abeta peptides». *J Biol Inorg Chem* 9: 954-960.

Hubbard JA, Martin SR, Chaplin LC, Bose C, Kelly SM et Price NC. 1991. «Solution structures of calcitonin-gene-related-peptide analogues of calcitonin-gene-related peptide and amylin». *Biochem J* 275 ( Pt 3): 785-788.

Hull RL, Zraika S, Udayasankar J, Kisilevsky R, Szarek WA, Wight TN et Kahn SE. 2007. «Inhibition of glycosaminoglycan synthesis and protein glycosylation with WAS-406 and azaserine result in reduced islet amyloid formation in vitro». *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1586-1593.

Jan A, Adolfsson O, Allaman I, Buccarello AL, Magistretti PJ, Pfeifer A, Muhs A et Lashuel HA. 2011. «Abeta42 neurotoxicity is mediated by ongoing nucleated polymerization process rather than by discrete Abeta42 species». *J Biol Chem* 286: 8585-8596.

Janciauskiene S et Ahren B. 2000. «Fibrillar islet amyloid polypeptide differentially affects oxidative mechanisms and lipoprotein uptake in correlation with cytotoxicity in two insulin-producing cell lines». *Biochem Biophys Res Commun* 267: 619-625.

Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S et Butler PC. 1999. «The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles». *Diabetes* 48: 491-498.

Janson J, Soeller WC, Roche PC, Nelson RT, Torchia AJ, Kreutter DK et Butler PC. 1996. «Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide». *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7283-7288.

Jayasinghe SA et Langen R. 2004. «Identifying structural features of fibrillar islet amyloid polypeptide using site-directed spin labeling». *J Biol Chem* 279: 48420-48425.

Jha S, Patil SM, Gibson J, Nelson CE, Alder NN et Alexandrescu AT. 2011. «Mechanism of amylin fibrillization enhancement by heparin». *J Biol Chem* 286: 22894-22904.

Johnson SM, Connelly S, Fearn C, Powers ET et Kelly JW. 2012. «The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug». *J Mol Biol* 421: 185-203.

Kahn SE, D'Alessio DA, Schwartz MW, Fujimoto WY, Ensinck JW, Taborsky GJ, Jr. et Porte D, Jr. 1990. «Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by beta-cells». *Diabetes* 39: 634-638.

Kajava AV, Aebi U et Steven AC. 2005. «The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin». *J Mol Biol* 348: 247-252.

Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW et Glabe CG. 2003. «Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis». *Science* 300: 486-489.

Kelly JW. 2000. «Mechanisms of amyloidogenesis». *Nat Struct Biol* 7: 824-826.

Kirkitadze MD, Condon MM et Teplov DB. 2001. «Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis». *J Mol Biol* 312: 1103-1119.

Knight JD, Hebda JA et Miranker AD. 2006. «Conserved and cooperative assembly of membrane-bound alpha-helical states of islet amyloid polypeptide». *Biochemistry* 45: 9496-9508.

Knight JD et Miranker AD. 2004. «Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly». *J Mol Biol* 341: 1175-1187.

Konarkowska B, Aitken JF, Kistler J, Zhang S et Cooper GJ. 2005. «Thiol reducing compounds prevent human amylin-evoked cytotoxicity». *FEBS J* 272: 4949-4959.

Kudva YC, Mueske C, Butler PC et Eberhardt NL. 1998. «A novel assay in vitro of human islet amyloid polypeptide amyloidogenesis and effects of insulin secretory vesicle peptides on amyloid formation». *Biochem J* 331 ( Pt 3): 809-813.

Kumar S, Schlamadinger DE, Brown MA, Dunn JM, Mercado B, Hebda JA, Saraogi I, Rhoades E, Hamilton AD et Miranker AD. 2015. «Islet amyloid-induced cell death and bilayer integrity loss share a molecular origin targetable with oligopyridylamide-based alpha-helical mimetics». *Chem Biol* 22: 369-378.

Ladiwala AR, Mora-Pale M, Lin JC, Bale SS, Fishman ZS, Dordick JS et Tessier PM. 2011. «Polyphenolic glycosides and aglycones utilize opposing pathways to selectively remodel and inactivate toxic oligomers of amyloid beta». *Chembiochem* 12: 1749-1758.

Larson JL et Miranker AD. 2004. «The mechanism of insulin action on islet amyloid polypeptide fiber formation». *J Mol Biol* 335: 221-231.

Last NB, Rhoades E et Miranker AD. 2011. «Islet amyloid polypeptide demonstrates a persistent capacity to disrupt membrane integrity». *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9460-9465.

Lee J, Culyba EK, Powers ET et Kelly JW. 2011. «Amyloid-beta forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers». *Nat Chem Biol* 7: 602-609.

Leighton B et Cooper GJ. 1988. «Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro». *Nature* 335: 632-635.

Lerner UH. 2006. «Deletions of genes encoding calcitonin/alpha-CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone». *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 6: 87-95.

LeVine H, 3rd. 1993. «Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution». *Protein Sci* 2: 404-410.

Li XL, Xu G, Chen T, Wong YS, Zhao HL, Fan RR, Gu XM, Tong PC et Chan JC. 2009. «Phycocyanin protects INS-1E pancreatic beta cells against human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis through attenuating oxidative stress and modulating

JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways». *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1526-1535.

Linding R, Schymkowitz J, Rousseau F, Diella F et Serrano L. 2004. «A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins». *J Mol Biol* 342: 345-353.

Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC et Yankner BA. 1994. «Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus». *Nature* 368: 756-760.

Luca S, Yau WM, Leapman R et Tycko R. 2007. «Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR». *Biochemistry* 46: 13505-13522.

Lutz TA, Geary N, Szabady MM, Del Prete E et Scharrer E. 1995. «Amylin decreases meal size in rats». *Physiology & Behavior* 58: 1197-1202.

Magnan C et Ktorza A. 2005. «Production et sécrétion de l'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique». *EMC - Endocrinologie* 2: 241-264.

Magnus JH, Stenstad T, Kolset SO et Husby G. 1991. «Glycosaminoglycans in extracts of cardiac amyloid fibrils from familial amyloid cardiomyopathy of Danish origin related to variant transthyretin Met 111». *Scand J Immunol* 34: 63-69.

Magzoub M et Miranker AD. 2012. «Concentration-dependent transitions govern the subcellular localization of islet amyloid polypeptide». *FASEB J* 26: 1228-1238.

Makin OS et Serpell LC. 2005. «Structures for amyloid fibrils». *FEBS J* 272: 5950-5961.

Martin DJ et Ramirez-Alvarado M. 2010. «Comparison of amyloid fibril formation by two closely related immunoglobulin light chain variable domains». *Amyloid* 17: 129-136.

Marzban L, Soukhatcheva G et Verchere CB. 2005. «Role of carboxypeptidase E in processing of pro-islet amyloid polypeptide in  $\beta$ -cells». *Endocrinology* 146: 1808-1817.

Marzban L, Trigo-Gonzalez G, Zhu X, Rhodes CJ, Halban PA, Steiner DF et Verchere CB. 2004. «Role of beta-cell prohormone convertase (PC)1/3 in processing of pro-islet amyloid polypeptide». *Diabetes* 53: 141-148.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL et Beyreuther K. 1985. «Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome». *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4245-4249.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG et Foord SM. 1998. «RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor». *Nature* 393: 333-339.

Meier JJ, Kaye R, Lin CY, Gurlo T, Haataja L, Jayasinghe S, Langen R, Glabe CG et Butler PC. 2006. «Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent beta-cell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human IAPP». *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E1317-1324.

Mirzabekov TA, Lin MC et Kagan BL. 1996. «Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin». *J Biol Chem* 271: 1988-1992.

Mlynarczyk C et Fahraeus R. 2014. «Endoplasmic reticulum stress sensitizes cells to DNA damage-induced apoptosis through p53-dependent suppression of p21(CDKN1A.)». *Nat Commun* 5: 5067.

Mosselman S, Hoppener JW, Lips CJ et Jansz HS. 1989. «The complete islet amyloid polypeptide precursor is encoded by two exons». *FEBS Lett* 247: 154-158.

Mosselman S, Hoppener JW, Zandberg J, van Mansfeld AD, Geurts van Kessel AH, Lips CJ et Jansz HS. 1988. «Islet amyloid polypeptide: identification and chromosomal localization of the human gene». *FEBS Lett* 239: 227-232.

Motamedi-Shad N, Monsellier E, Torrassa S, Relini A et Chiti F. 2009. «Kinetic analysis of amyloid formation in the presence of heparan sulfate: faster unfolding and change of pathway». *J Biol Chem* 284: 29921-29934.

Muff R, Buhlmann N, Fischer JA et Born W. 1999. «An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3». *Endocrinology* 140: 2924-2927.

Nakamura M, Hashimoto T, Nakajima T, Ichii S, Furuyama J, Ishihara Y et Kakudo K. 1995. «A new type of human calcitonin receptor isoform generated by alternative splicing». *Biochem Biophys Res Commun* 209: 744-751.

Nanga RP, Brender JR, Vivekanandan S et Ramamoorthy A. 2011. «Structure and membrane orientation of IAPP in its natively amidated form at physiological pH in a membrane environment». *Biochim Biophys Acta* 1808: 2337-2342.

Nanga RP, Brender JR, Xu J, Hartman K, Subramanian V et Ramamoorthy A. 2009. «Three-dimensional structure and orientation of rat islet amyloid polypeptide protein in a membrane environment by solution NMR spectroscopy». *J Am Chem Soc* 131: 8252-8261.

Nankervis A, Proietto J, Aitken P et Alford F. 1985. «Hyperinsulinaemia and insulin insensitivity: studies in subjects with insulinoma». *Diabetologia* 28: 427-431.

Nath A, Miranker AD et Rhoades E. 2011. «A membrane-bound antiparallel dimer of rat islet amyloid polypeptide». *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 10859-10862.

Nishi M, Chan SJ, Nagamatsu S, Bell GI et Steiner DF. 1989. «Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone». *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5738-5742.

Opie EL. 1901. «On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the islands of Langerhans and to diabetes melitus ». *J Exp Med* 5: 397-428.



Orrenius S, McCabe MJ, Jr. et Nicotera P. 1992. «Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death». *Toxicol Lett* 64-65 Spec No: 357-364.

Paravastu AK, Leapman RD, Yau WM et Tycko R. 2008. «Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils». *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 18349-18354.

Park YJ, Lee S, Kieffer TJ, Warnock GL, Safikhani N, Speck M, Hao Z, Woo M et Marzban L. 2012. «Deletion of Fas protects islet beta cells from cytotoxic effects of human islet amyloid polypeptide». *Diabetologia* 55: 1035-1047.

Patil SM, Xu S, Sheftic SR et Alexandrescu AT. 2009. «Dynamic alpha-helix structure of micelle-bound human amylin». *J Biol Chem* 284: 11982-11991.

Placido AI, Oliveira CR, Moreira PI et Pereira CM. 2015. «Enhanced amyloidogenic processing of amyloid precursor protein and cell death under prolonged endoplasmic reticulum stress in brain endothelial cells». *Mol Neurobiol* 51: 571-590.

Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW et Balch WE. 2009. «Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency». *Annu Rev Biochem* 78: 959-991.

Puchtler H et Sweat F. 1965. «Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid». *J Histochem Cytochem* 13: 693-694.

Relini A, Cavalleri O, Rolandi R et Gliozzi A. 2009. «The two-fold aspect of the interplay of amyloidogenic proteins with lipid membranes». *Chemistry and Physics of Lipids* 158: 1-9.

Rizza RA, Mandarino LJ, Genest J, Baker BA et Gerich JE. 1985. «Production of insulin resistance by hyperinsulinaemia in man». *Diabetologia* 28: 70-75.

Salamekh S, Brender JR, Hyung SJ, Nanga RP, Vivekanandan S, Ruotolo BT et Ramamoorthy A. 2011. «A two-site mechanism for the inhibition of IAPP amyloidogenesis by zinc». *J Mol Biol* 410: 294-306.

Saltiel AR. 2001. «New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes». *Cell* 104: 517-529.

Sanke T, Bell GI, Sample C, Rubenstein AH et Steiner DF. 1988. «An islet amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing». *J Biol Chem* 263: 17243-17246.

Saraogi I, Hebda JA, Becerril J, Estroff LA, Miranker AD et Hamilton AD. 2010. «Synthetic alpha-helix mimetics as agonists and antagonists of islet amyloid polypeptide aggregation». *Angew Chem Int Ed Engl* 49: 736-739.

Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF et Lindquist SL. 2000. «Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant». *Science* 289: 1317-1321.

Sexton PM, Paxinos G, Kenney MA, Wookey PJ et Beaumont K. 1994. «In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain». *Neuroscience* 62: 553-567.

Shigihara N, Fukunaka A, Hara A, Komiya K, Honda A, Uchida T, Abe H, Toyofuku Y, Tamaki M, Ogihara T, Miyatsuka T, Hiddinga HJ, Sakagashira S, Koike M, Uchiyama Y, Yoshimori T, Eberhardt NL, Fujitani Y et Watada H. 2014. «Human IAPP-induced pancreatic beta cell toxicity and its regulation by autophagy». *J Clin Invest* 124: 3634-3644.

Shim SH, Gupta R, Ling YL, Strasfeld DB, Raleigh DP et Zanni MT. 2009. «Two-dimensional IR spectroscopy and isotope labeling defines the pathway of amyloid formation with residue-specific resolution». *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 6614-6619.

Soong R, Brender JR, Macdonald PM et Ramamoorthy A. 2009. «Association of highly compact type II diabetes related islet amyloid polypeptide intermediate species at physiological temperature revealed by diffusion NMR spectroscopy». *J Am Chem Soc* 131: 7079-7085.

Sparr E, Engel MF, Sakharov DV, Sprong M, Jacobs J, de Kruijff B, Hoppener JW et Killian JA. 2004. «Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers». *FEBS Lett* 577: 117-120.

Sumner Makin O et Serpell LC. 2004. «Structural characterisation of islet amyloid polypeptide fibrils». *J Mol Biol* 335: 1279-1288.

Susa AC, Wu C, Bernstein SL, Dupuis NF, Wang H, Raleigh DP, Shea JE et Bowers MT. 2014. «Defining the molecular basis of amyloid inhibitors: human islet amyloid polypeptide-insulin interactions». *J Am Chem Soc* 136: 12912-12919.

Talmard C, Bouzan A et Faller P. 2007. «Zinc binding to amyloid-beta: isothermal titration calorimetry and Zn competition experiments with Zn sensors». *Biochemistry* 46: 13658-13666.

Tchoumi Neree A, Nguyen PT, Chatenet D, Fournier A et Bourgault S. 2014. «Secondary conformational conversion is involved in glycosaminoglycans-mediated cellular uptake of the cationic cell-penetrating peptide PACAP». *FEBS Lett* 588: 4590-4596.

Tilakaratne N, Christopoulos G, Zumpfe ET, Foord SM et Sexton PM. 2000. «Amylin receptor phenotypes derived from human calcitonin receptor/RAMP coexpression exhibit pharmacological differences dependent on receptor isoform and host cell environment». *J Pharmacol Exp Ther* 294: 61-72.

Uversky VN, Li J et Fink AL. 2001. «Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure». *J Biol Chem* 276: 44284-44296.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L et Vaudry H. 2009. «Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery». *Pharmacol Rev* 61: 283-357.

Voet D et Voet JG. 2004. «Biochemistry». J. Wiley & Sons, New York.

Wang L, Li Y, Lu T et Li F. 2014. «The effects of organic solvents on the membrane-induced fibrillation of human islet amyloid polypeptide and on the inhibition of the fibrillation». *Biochim Biophys Acta* 1838: 3162-3170.

Westermarck P. 2011. «Amyloid in the islets of Langerhans: thoughts and some historical aspects». *Ups J Med Sci* 116: 81-89.

Westermarck P, Andersson A et Westermarck GT. 2011. «Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus». *Physiol Rev* 91: 795-826.

Westermarck P, Li ZC, Westermarck GT, Leckstrom A et Steiner DF. 1996. «Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation». *FEBS Lett* 379: 203-206.

Westermarck P, Wernstedt C, Wilander E, Hayden DW, O'Brien TD et Johnson KH. 1987. «Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells». *Proc Natl Acad Sci US A* 84: 3881-3885.

Westermarck P, Wernstedt C, Wilander E et Sletten K. 1986. «A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas». *Biochem Biophys Res Commun* 140: 827-831.

Westwell-Roper C, Dai DL, Soukhatcheva G, Potter KJ, van Rooijen N, Ehses JA et Verchere CB. 2011. «IL-1 blockade attenuates islet amyloid polypeptide-induced proinflammatory cytokine release and pancreatic islet graft dysfunction». *J Immunol* 187: 2755-2765.

Wieprecht T, Dathe M, Schumann M, Krause E, Beyermann M et Bienert M. 1996. «Conformational and functional study of magainin 2 in model membrane environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement». *Biochemistry* 35: 10844-10853.

Williamson JA, Loria JP et Miranker AD. 2009. «Helix stabilization precedes aqueous and bilayer-catalyzed fiber formation in islet amyloid polypeptide». *J Mol Biol* 393: 383-396.

Williamson JA et Miranker AD. 2007. «Direct detection of transient alpha-helical states in islet amyloid polypeptide». *Protein Sci* 16: 110-117.

Wimalawansa SJ. 1997. «Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily». *Crit Rev Neurobiol* 11: 167-239.

Wogulis M, Wright S, Cunningham D, Chilcote T, Powell K et Rydel RE. 2005. «Nucleation-dependent polymerization is an essential component of amyloid-mediated neuronal cell death». *J Neurosci* 25: 1071-1080.

Wookey PJ, Tikellis C, Du HC, Qin HF, Sexton PM et Cooper ME. 1996. «Amylin binding in rat renal cortex, stimulation of adenylyl cyclase, and activation of plasma renin». *Am J Physiol* 270: F289-294.

Yamin G, Munishkina LA, Karymov MA, Lyubchenko YL, Uversky VN et Fink AL. 2005. «Forcing nonamyloidogenic beta-synuclein to fibrillate». *Biochemistry* 44: 9096-9107.

Yonemoto IT, Kroon GJ, Dyson HJ, Balch WE et Kelly JW. 2008. «Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state». *Biochemistry* 47: 9900-9910.

Young AA. 1997. «Amylin's physiology and its role in diabetes». *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 4: 282-290.

Young ID, Ailles L, Narindrasorasak S, Tan R et Kisilevsky R. 1992. «Localization of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan in islet amyloid deposits in type II diabetes mellitus». *Arch Pathol Lab Med* 116: 951-954.

Zhang S, Andreasen M, Nielsen JT, Liu L, Nielsen EH, Song J, Ji G, Sun F, Skrydstrup T, Besenbacher F, Nielsen NC, Otzen DE et Dong M. 2013. «Coexistence of ribbon

and helical fibrils originating from hIAPP(20-29) revealed by quantitative nanomechanical atomic force microscopy». *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 2798-2803.

Zhang S, Liu J, Saafi EL et Cooper GJ. 1999. «Induction of apoptosis by human amylin in RINm5F islet beta-cells is associated with enhanced expression of p53 and p21WAF1/CIP1». *FEBS Lett* 455: 315-320.

Zhu M, Li J et Fink AL. 2003. «The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation». *J Biol Chem* 278: 40186-40197.

Zraika S, Hull RL, Udayasankar J, Aston-Mourney K, Subramanian SL, Kisilevsky R, Szarek WA et Kahn SE. 2009. «Oxidative stress is induced by islet amyloid formation and time-dependently mediates amyloid-induced beta cell apoptosis». *Diabetologia* 52: 626-635.